

**Das Miz1-interagierende Protein TopBP1:
Identifizierung neuer Interaktionspartner und Untersuchungen
zur Rolle bei der Zellzyklusregulation**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Yvonne Wollmann

geboren am 13. April 1976 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Hans-Peter Saluz
2. Prof. Frank Große
3. Prof. Martin Eilers

Tag des Rigorosums: 27. Juli 2005

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10. Oktober 2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Das Zinkfingerprotein Miz1	2
1.2 Das Topoisomerase II β -Bindeprotein 1 (TopBP1)	7
1.3 RNA-Interferenz	11
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Allgemeines	14
2.2 Material	14
2.2.1 Stämme und Zelllinien	14
2.2.2 Vektoren und Plasmide	15
2.2.3 Klonierungsprimer	16
2.2.4 Medien	16
2.2.4.1 Medien zur Anzucht und Kultur von Bakterien	16
2.2.4.2 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen	16
2.2.5 Stammlösungen	17
2.2.6 Puffer	18
2.2.7 Chemikalien	19
2.2.8 Größenstandards	21
2.2.9 Enzyme	21
2.2.10 Filme, Filter und Geräte	21
2.2.11 Antikörper	22
2.2.11.1 Primärantikörper	22
2.2.11.2 Sekundärantikörper	23
2.2.12 Kits	23
2.3 Methoden	23
2.3.1 Bakterien-Zellkultur	23
2.3.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i> nach Hanahan (1983)	23
2.3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	23

3. Ergebnisse	38
3.1 Funktionelle Untersuchungen von TopBP1: Identifizierung neuer Interaktionspartner	38
3.1.1 Präsenz einer potentiellen poly(ADP-Ribose)-Bindestelle innerhalb des TopBP1 Proteins	38
3.1.2 <i>In vitro</i> Interaktion von TopBP1 und PARP-1	39
3.1.3 <i>In vivo</i> Interaktion von TopBP1 und PARP-1	43
3.1.4 Kolokalisation von TopBP1 und PARP-1 in den Kernen von HeLa-Zellen	44
3.1.5 PARP-1 ADP-ribosyliert TopBP1-BRCT6	45
3.1.6 TopBP1 liegt in humanen Zellen Chromatin-assoziiert vor	48
3.1.7 <i>In vivo</i> Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45	50
3.1.8 <i>In vitro</i> Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45	51
3.2 Untersuchungen zu den Effekten einer Suppression der TopBP1-Expression mittels RNA-Interferenz in humanen Zellen	53
3.2.1 Konstruktion von pSUPER-TopBP1	53
3.2.2 Stabile Expression der TopBP1-siRNA in humanen Zellen	54
3.2.3 Analyse der Genexpression nach Abregulation von TopBP1	55
3.2.4 Einfluss des TopBP1- <i>knock downs</i> auf das Wachstum etablierter Zelllinien	59
4. Diskussion	61
4.1 Identifizierung von PARP-1 als neuen Interaktionspartner von TopBP1 – regulatorische Konsequenzen für das Myc-Miz1-Netzwerk?	61
4.2 TopBP1 ist Chromatin-assoziiert und bindet an Cdc45 – Hinweise auf eine Rolle in der Replikation?	67
4.3 Die Folgen eines TopBP1 <i>knock down</i> durch RNA-Interferenz	72
4.4 Ausblick	78
5. Zusammenfassung	80
6. Literaturverzeichnis	82
Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
AD	-	Automodifikationsdomäne
ADP	-	Adenosindiphosphat
AIF	-	<i>apoptosis inducing factor</i>
APC	-	<i>adenomatous polyposis coli</i>
AS	-	Aminosäure
ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i> (kommerzielle Zell- und Gewebebank)
ATM	-	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	-	Adenosintriphosphat
ATR	-	<i>ATM related</i>
bp	-	Basenpaare
BRCA1	-	<i>breast cancer susceptibility gene 1</i>
BRCT	-	BRCA1 Carboxy-Terminus
BSA	-	Bovines Serumalbumin
Cdc	-	<i>cell division control</i>
Cdk	-	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	-	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
CTP	-	Cytidintriphosphat
ctr.	-	<i>control</i> (Kontrolle)
DAPI	-	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DBD	-	DNA-Bindedomäne
DDK	-	<i>Dbf4-dependent kinases</i> (Dbf4-abhängige Kinasen)
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ds	-	<i>double strand</i> (Doppelstrang)
dNTP	-	Desoxynukleosidtriphosphat
dNDP	-	Desoxynukleosiddiphosphat
DSB	-	Doppelstrangbrüche
DTT	-	Dithiothreitol
ECL	-	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EGTA	-	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS	-	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflusszytometer)
FCS	-	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	-	Fluoresceinisothiocyant
GTP	-	Guanosintriphosphat
GST	-	Glutathion S-Transferase
HPV	-	Humane Papillomaviren
HRP	-	<i>horse-radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IC	-	Initiationskomplex
IF	-	Immunofluoreszenz
IP	-	Immunopräzipitation
IPTG	-	Isopropylthio- β -D-galactosid
IVT	-	<i>in vitro</i> Translation/Translatat
kDa	-	Kilodalton
MCM	-	<i>minichromosome maintenance</i>
MOPS	-	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	-	<i>messenger ribonucleic acid</i>

NAD	-	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NBS	-	<i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>
nt	-	Nukleotide
OD	-	optische Dichte
ORC	-	<i>origin recognition complex</i>
PAGE	-	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	-	Poly(ADP-Ribose)
PARP	-	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	-	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCNA	-	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	-	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI3-Kinase	-	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLM	-	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
PMSF	-	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol α /Prim	-	DNA-Polymerase α /Primase
Pol ϵ	-	DNA-Polymerase ϵ
pre-RC	-	<i>pre-replication complex</i> (prä-replikativer Komplex)
PVDF	-	Polyvinylidenfluorid
Rb	-	Retinoblastoma
RISC	-	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	-	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	-	RNA Interferenz
RPA	-	<i>replication protein 1</i>
rpm	-	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRX	-	RhodaminX
RT	-	Raumtemperatur
RT-PCR	-	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDS	-	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	-	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
ss	-	<i>single strand</i> (Einzelstrang)
Tab.	-	Tabelle
TBS	-	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TCF-4	-	<i>T-cell factor</i>
TdR	-	Thymin
TEMED	-	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	-	<i>tumor growth factor-β</i>
Tris	-	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	-	Thymintriphosphat
U	-	<i>unit</i> (Einheit)
UV	-	ultraviolett
WB	-	Western Blot
XRCC1	-	<i>X-ray repair cross-complementing 1</i>

1. Einleitung

Jede Sekunde ereignen sich im menschlichen Organismus mehrere Millionen Zellteilungen. Das Überleben des Organismus ist von der akkuraten Übertragung der genetischen Information einer Zelle auf die Tochterzellen abhängig. Die Voraussetzung hierfür liegt nicht nur in einer extremen Genauigkeit bei der Replikation der DNA und der präzisen Verteilung der Chromosomen, sondern auch in der Fähigkeit, spontane oder induzierte DNA-Schäden zu überleben und die Anzahl vererbbarer Mutationen zu minimieren. Die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ist somit essentiell, um die Bildung von Neoplasien zu verhindern.

Um einen reibungslosen und geordneten Ablauf dieser Prozesse zu gewährleisten, verfügen die Zellen aller Lebewesen über entsprechende Kontrollmechanismen im Rahmen des Zellzyklus. Diese Mechanismen überwachen die Vollendung wichtiger Zellzyklusabschnitte (z.B. vollständige DNA-Synthese) und sorgen für die richtige Reihenfolge der Ereignisse. Das heisst, der Übergang in eine neue Zellzyklusphase kann nur stattfinden, wenn die vorherige Phase abgeschlossen ist.

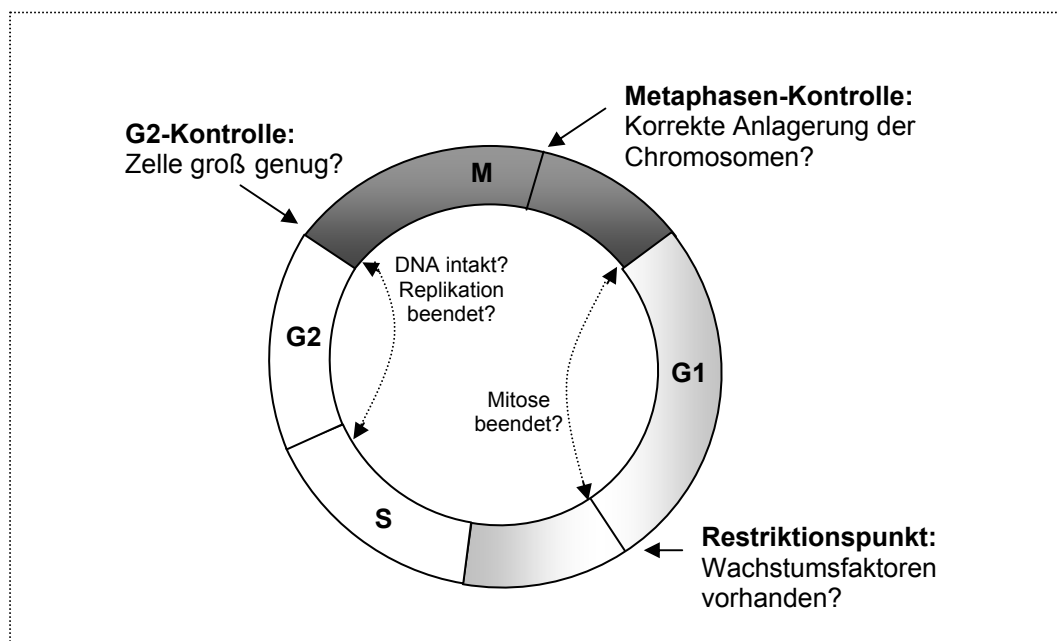


Abb. 1: Kontrollpunkte des Zellzyklus: externe und interne Kontrollmechanismen.

Wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus befinden sich am Ende der G2-Phase (G2/M-Übergang), in der Mitose (Metaphase/Anaphase-Übergang) und in der G1-Phase (Restriktionspunkt). Nach Krauss, 2003.

Viele Kontrollmechanismen des Zellzyklus sind konstitutiv. Sie treten in jedem Zellzyklus in Kraft und sichern die Aufeinanderfolge der individuellen Schritte ab. Zusätzlich zu diesen intrinsischen Kontrolleinrichtungen unterliegen Zellen auch externen Einflüssen (z.B. Wachstumsfaktoren, Zell-

Zell-Kontakte), die absichern, dass die Zellteilungen auf die Gesamtentwicklung des Organismus und die Wachstumsbedingungen abgestimmt sind.

Lebende Zellen sind fortwährend chemischem und physikalischem Stress ausgesetzt. Die molekularen Bestandteile der Zelle können dabei in ihrer Struktur geschädigt werden. Treten Fehler auf, weil das genetische Material Schädigungen aufweist und die DNA-Replikation nicht beendet wird, kommt es zur Verzögerung im Fortlauf des Zellzyklus in der G1-, S- oder G2-Phase. Sogenannte *checkpoints* registrieren die Schäden und leiten die Schadenssignale über evolutionär konservierte Signalwege an verschiedene zelluläre Systeme weiter. Diese koordinieren die DNA-Reparatur und den Fortlauf des Zellzyklus oder induzieren im Fall exzessiver Schäden den programmierten Zelltod. Werden diese Kontrollmechanismen außer Kraft gesetzt, so kommt es häufig zur Tumorbildung.

1.1 Das Zinkfingerprotein Miz1

Über ein Zwei-Hybrid-Screening in der Hefe wurde vor acht Jahren ein Protein identifiziert, das mit Myc über dessen Carboxyterminus interagiert: Miz1 (*Myc-interacting zinc finger protein* 1). Dabei handelt es sich um ein Zinkfingerprotein mit 13 Zinkfingern vom Cys2-His2-Typ. Zwölf von ihnen sind unmittelbar nacheinander in Tandem-Wiederholungen angeordnet. Der 13. Zinkfinger ist von der zentralen Gruppe durch eine Sequenz von 80 Aminosäuren abgetrennt. Diese Region formt eine α -Helix und ist hoch konserviert. Am Aminoterminal besitzt Miz1 eine POZ- oder BTB-Domäne (für „Poxvirus und Zinkfinger“ bzw. Bric á brac, Tramtrack, Broad Complex, Peukert *et al.*, 1997).

Eine Deletionsanalyse ergab, dass Myc über seine Helix-Loop-Helix Domäne an Miz1 bindet. In Miz1 sind die Region zwischen dem 12. und 13. Zinkfinger sowie ein aminoterminaler Bereich vor dem ersten Zinkfinger für die Assoziation mit Myc erforderlich (Peukert *et al.*, 1997).

Mit der POZ-Domäne besitzt Miz1 ein konserviertes Proteinmotiv, das in vielen Proteinen vorkommt und für die Vermittlung von Proteininteraktionen verantwortlich ist (Bardwell & Treisman, 1994). Der hydrophobe Charakter dieser ca. 120 Aminosäuren umfassenden Domäne wird durch konservierte Reste an 37 Positionen bestimmt. Die Röntgenstrukturanalyse der POZ-Domäne von PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger protein*) zeigte, dass sie aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern besteht (Ahmad *et al.*, 1998). Über POZ-Domänen kann sowohl die Ausbildung von Homodimeren als auch die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt werden (Dhordain *et al.*, 1995). Für Miz1 wurde bisher keine Homodimerisierung nachgewiesen.

Im Gegensatz zu vielen anderen POZ-Domänen Proteinen, die im Zellkern zu schwerlöslichen Aggregaten assoziieren, liegt Miz1 als lösliches Protein überwiegend im Zytoplasma vor (Bardwell & Treisman, 1994, Peukert *et al.*, 1997). Eine Kernlokalisierungssequenz ist in Miz1 nicht

enthalten. Erst die ektopische Koexpression von Myc führt zum Kernimport von Miz1 und zur Ausbildung subnukleärer Aggregate in denen die beiden Proteine kolokalisiert sind. Durch die Assoziation von Myc werden also die physikalischen Eigenschaften von Miz1 verändert. Für diese Veränderungen ist eine intakte POZ-Domäne notwendig (Peukert *et al.*, 1997).

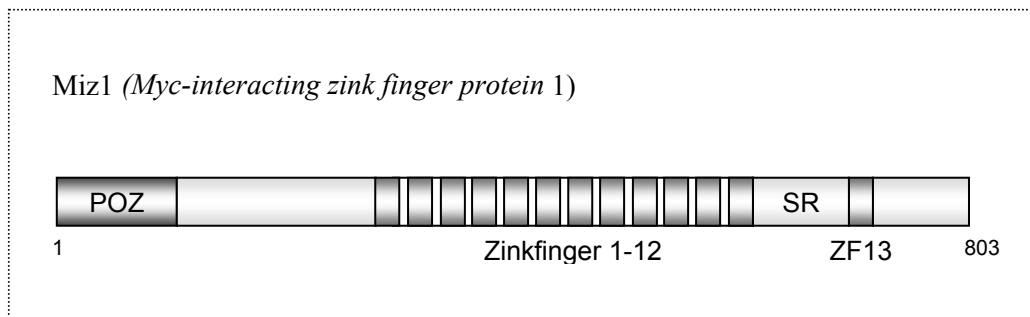


Abb. 2: Schematische Darstellung von Miz1

Die funktionellen und strukturellen Domänen sind hervorgehoben: POZ-Domäne, Zinkfinger 1-12, Spacerregion und Zinkfinger 13.

Die meisten bisher funktionell analysierten Zinkfingerproteine mit POZ-Domäne fungieren als transkriptionelle Repressoren. Eine Ausnahme bildet das ZF5-Protein. Es bindet den HIV-1 LTR Promotor und aktiviert diesen, während es den β -Aktin Promotor reprimiert (Kaplan & Calame, 1997). Auch für Miz1 sind sowohl transaktivierende als auch transreprimierende Funktionen bekannt (Peukert *et al.*, 1997, Staller *et al.*, 2001, Seoane *et al.*, 2001, Kime & Wright, 2003, Bowen *et al.*, 2003, Wanzel *et al.*, 2005). Miz1 bindet in unmittelbarer Nähe der transkriptionellen Startpunkte von verschiedenen, von der RNA Polymerase II abhängigen Promotoren. Dazu zählen der Cyclin D1-Promotor, der AdML-Promotor (*Adenovirus Major Late*-Promotor, Peukert *et al.*, 1997) sowie die Promotoren der *P15INK4B*- und *P21CIP1*-Gene (Staller *et al.*, 2001, Seoane *et al.*, 2001). Die gebundenen Sequenzen werden auch als Initiatorelemente (INR-Elemente) bezeichnet. Dabei handelt es sich um schwache Konsensussequenzen (YYCAYYYYYY, Y ist eine Pyrimidinbase), welche die korrekte Initiation der Transkription bewirken (Smale & Baltimore, 1989). Vermutlich kann Miz1 durch verschiedene Kombination seiner 13 Zinkfinger unterschiedliche DNA-Sequenzen erkennen. So bindet zum Beispiel das Zinkfingerprotein CTCF1 variable Sequenzen innerhalb der DNA durch Nutzung verschiedener Anteile seiner insgesamt elf Zinkfinger (Filippova *et al.*, 1996).

Die ektopische Expression von Miz1 in RAT1-Zellen induziert einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Dieser Zellzyklusarrest wird durch die Bindung und transkriptionelle Aktivierung des *P15INK4B*-Promotors durch Miz1 erreicht. Das Protein p15 gehört zu den Cdk-Inhibitoren (*Cyclin dependent kinase inhibitor*). Diese Proteinfamilie assoziiert mit einer Cdk (*Cyclin dependent*

kinase) und inhibiert deren Aktivität. Dadurch wird die Bildung von Cdk4/6-Komplexen mit D-Typ Cyclinen verhindert (Roussel *et al.*, 1999). Zu den wichtigsten Substraten der Cdks in der G1/S-Phase zählen die sogenannten Pocketproteine Rb, p107 und p130. Wird beispielsweise die Phosphorylierung von Rb verhindert, kommt es nicht zur Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität für den Eintritt in die S-Phase bedeutend ist. Miz1 benötigt für diese Transaktivierung des *P15INK4B*-Promotors den Koaktivator p300 (Staller *et al.*, 2001). Neben der Überexpression von Miz1 führt auch das anti-mitogene Zytokin TGF- β zur Induktion der Zellzyklusinhibitoren *P15INK4B* und *P21CIP1*. Seoane *et al.* (2001) zeigten, dass Miz1 dabei synergistisch mit Smad3/4- und Sp1-Proteinen den *P15INK4B*-Promotor transaktiviert. Insgesamt sind neun Smad-Proteine bekannt, die als Bestandteil der Signalkaskade abwärts der membranständigen TGF- β /BMP-Rezeptorfamilie wirken (Überblick in ten Dijke *et al.*, 2000).

In verschiedenen Studien wurde demonstriert, dass das Onkoprotein Myc in der Lage ist, einen Arrest des Zellzyklus zu überwinden (Überblick in Wanzel *et al.*, 2003, Gartel & Shchors, 2003). Das Myc-Protein ist ein wichtiger Regulator vieler zellulärer Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Überblick in Grandori *et al.*, 2000). Während Zellen, denen Myc fehlt, im Wachstum beeinträchtigt sind (Trumpf *et al.*, 2001), stimuliert eine deregulierte Expression von Myc die Proliferation in Abwesenheit von externen Wachstumsfaktoren (Eilers *et al.*, 1991). Diese vielfältigen zellulären Funktionen von Myc beruhen auf der Fähigkeit, die Transkription verschiedener Gene sowohl zu aktivieren als auch zu reprimieren. Die transkriptionelle Aktivierung erfolgt durch Dimerisierung von Myc mit dem Protein Max und der direkten Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, so genannte E-Box-Elemente mit der Basenabfolge CA(C/T)GTG (Eisenman, 2001, Levens, 2003, 2002) oder auch auf Ebene des Chromatins durch die Assoziation mit dem Kofaktor TRRAP und die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen (Levens, 2003). Antagonisten der Transaktivierung durch Myc sind die Mad-Proteine, die ebenfalls mit Max heterodimerisieren und dieselben DNA-Sequenzen binden. Die Mechanismen der transkriptionellen Repression durch Myc sind bisher noch nicht genau verstanden. Vermutlich geschieht die Repression nicht durch DNA-Bindung, denn eine direkte Assoziation des Myc/Max-Komplexes mit dem Transkriptionsstart wurde nur im Fall der Repression des *P27KIP1*-Promotors nachgewiesen (Yang *et al.*, 2001). Vielmehr kommt eher die Rekrutierung von Myc zu den Promotoren über Protein-Protein-Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren in Frage, wie z.B. mit TFII-I (Roy *et al.*, 1993), NF-Y (Izumi *et al.*, 2001), YY-1 (Shrivastava *et al.*, 1993) und Miz1 (Peukert *et al.*, 1997).

Im Fall von Miz1 wurde in mehreren Studien gezeigt, dass durch die Assoziation mit Myc die Transaktivierung der *P15INK4B*- und *P21CIP1*-Gene, die beide für Cdk-Inhibitoren codieren,

negativ reguliert wird (Seoane *et al.*, 2001, 2002, Staller *et al.*, 2001, Herold *et al.*, 2002, van de Wetering *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2003). Das liegt zum Teil an der Konkurrenz zwischen Miz1 und Myc um die Bindung des Kofaktors p300 (Staller *et al.*, 2001). Zusätzlich interagiert Myc aber auch direkt mit Smad-Proteinen und kann auf diese Weise womöglich verschiedene TGF- β -abhängige Promotoren inhibieren (Wanzel *et al.*, 2003, siehe Abb.3a).

Ein ähnliches Modell wie für die Kontrolle des *P15INK4B*-Promoters wurde auch für die Regulation der *P21CIP1*-Expression aufgestellt. Die Bindung des Myc-Miz1-Komplexes spielt z.B. eine Rolle bei der TPA-induzierten Differenzierung von Monozyten und korreliert mit der transkriptionellen Induktion der *P21CIP1*-Expression (Wu *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel ist die Regulation der Proliferation von epithelialen Kolonzellen durch den APC-Signalweg. Ein frühes Ereignis in der Entwicklung der meisten kolorektalen Tumore ist die Inaktivierung des Gens für das Tumorsuppressorprotein APC (*adenomatous polyposis coli*). Das Protein p21^{Cip1} ist wichtig für die Abstimmung von Proliferation und Differenzierung durch Myc und TCF-4 (*T-cell factor*). In proliferierenden Zellen ist der Myc-Miz1-Komplex an den *P21CIP1*-Promotor gebunden und der Promotor damit inaktiv. Die Menge von gebundenen Myc wird hierbei durch TCF-4 reguliert, während Miz1 unbeeinflusst bleibt. Die Inhibition des APC-Signalweges durch Expression eines dominant-negativen Allels von TCF-4 führt zum Zellzyklusarrest und zur Differenzierung (van de Wetering *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivität des *P21CIP1*-Promotors unter anderem durch die Mengenverhältnisse von Miz1 und Myc reguliert wird.

Auch bei der Reaktion der Zelle auf DNA-Schädigungen ist der Myc-Miz1-Komplex neben p53-abhängigen Mechanismen von Bedeutung (Abb.3b). Als ein Effektorgen von p53 besitzt der *P21CIP1*-Promotor zwei p53-empfindliche Elemente (El-Deiry, *et al.*, 1995). Für die Expression von *P21CIP1* nach UV-Bestrahlung ist p53 notwendig und führt zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Deng *et al.*, 1995). Herold *et al.* (2002) zeigten, dass dieser Effekt der Schadensantwort durch Myc überwunden werden kann, da auch Miz1 an der Aufregulation der *P21CIP1*-Expression nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung beteiligt ist und bei Bindung von Myc an Miz1 diese Funktion inhibiert wird. Die Myc-vermittelte Repression des *P21CIP1*-Promotors beinhaltet zudem die Rekrutierung von Dnmt3a als Korepressor (Brenner *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um ein Protein mit Methyltransferase-Aktivität. Die DNA-Methylierung an CpG-Dinukleotiden ist eine häufige epigenetische Modifikation in Säugerzellen und führt zur transkriptionellen Repression von Genen. Brenner *et al.* (2004) schlagen als Mechanismus der Repression die Bildung eines ternären Komplexes aus Miz1, Myc und Dnmt3a am *P21CIP1*-Promotor vor. Die Korepressor-Aktivität von Dnmt3a und Myc ist dabei von der Interaktion zwischen Miz1 und Myc abhängig.

Die Miz1-Funktion wird außerdem durch einen weiteren Faktor reguliert. Zumindest eine Teilfraktion von Miz1 ist in ungestressten Zellen mit TopBP1 assoziiert und ist in diesem Zustand

inaktiv. Nach UV-Bestrahlung wird Miz1 aus diesem Komplex freigesetzt, was mit der Aktivierung von Miz1 als Transkriptionsfaktor einhergeht (Herold *et al.*, 2002).

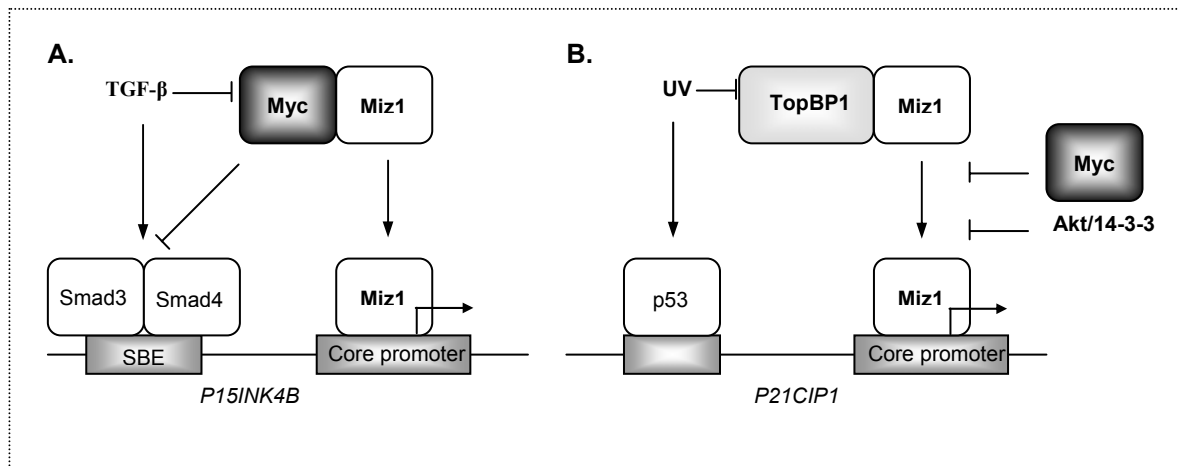


Abb.3: Dual input-Modell für die Regulation der *P15INK4B*- und *P21CIP1*-Promotoren (modifiziert nach Wanzel *et al.* (2003))

Gene, die durch TGF-β, den APC-Signalweg oder nach UV-Bestrahlung reguliert werden, unterliegen auch der Kontrolle von Myc und Miz1 am Kernpromotor.

- Regulation der Expression von *P15INK4B*. TGF-β führt zur Abregulation von *c-myc* und zur Freisetzung von Miz1 aus dem inhibitorischen Komplex mit Myc, so dass Miz1 mit der Koaktivator p300 interagieren kann. TGF-β aktiviert außerdem Smad-Proteine, die mit Miz1 bei der Promotor-Aktivierung kooperieren.
- Regulation der Expression von *P21CIP1*. Nach UV-Bestrahlung wird Miz1 aus dem inhibitorischen Komplex mit TopBP1 freigesetzt und bindet den Transkriptionsstart des *P21CIP1*-Promotors. Die Aktivierung benötigt auch aktives p53. Über die Assoziation mit Miz1 kann Myc und 14-3-3η die *P21CIP1*-Aktivierung negativ beeinflussen.

Wanzel *et al.* (2005) identifizierten kürzlich mit 14-3-3η ein Protein, dessen Überexpression in Rat-1-Zellen einen Miz1-induzierten Zellzyklusarrest ebenso effizient überwinden kann wie Myc. Dabei bindet 14-3-3η Miz1 und verhindert die Assoziation von Miz1 mit DNA durch zwei Stellen, die innerhalb bzw. nahe der DNA-Bindedomäne liegen. 14-3-3-Proteine sind Dimere, die mit ihren Partnerproteinen Phosphorylierungs-abhängig interagieren (Überblick in Hermeking, 2003). Miz1 wird durch Akt (eine stromabwärts der PI3-Kinase agierende und von Wachstumsfaktoren abhängige Kinase) am Serin428 phosphoryliert. Dadurch wird die Interaktion der 14-3-3-Proteine mit Miz1 und somit die Erholung der Zellen nach DNA-Schädigung reguliert (Wanzel *et al.*, 2005). Die Bindung von 14-3-3η und die Phosphorylierung von Miz1 ist nur nach Stresseinwirkung von Bedeutung. Denn in ungestressten, proliferierenden Zellen hat eine Abregulation der Miz1-Expression nur minimale Effekte auf die Genexpression. Auch der Ersatz von Wildtyp-Miz1 durch eine Mutante, die nicht von Akt phosphoryliert werden kann (S428A) inhibiert erst nach UV-Bestrahlung das Auswachsen von Kolonien und damit die Erholung der Zellen aus dem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus.

Anhand von DNA-Mikroarray-Analysen konnte außerdem gezeigt werden, dass Miz1 nach DNA-Schädigung einerseits für die Aktivierung von Genen verantwortlich ist und andererseits auch für die Repression einer Gruppe von Genen. Die Aktivierung wird durch Myc reprimiert. Im Gegensatz dazu wird die Genrepressionsfunktion von Miz1 durch Akt und 14-3-3 η reguliert, nicht durch Myc. Die Aufregulation von *P21CIP1* durch Miz1 hingegen wird sowohl von Myc als auch von Akt/14-3-3 η beeinflusst.

1.2 Das Topoisomerase II β -Bindepotein 1 (TopBP1)

Das Protein TopBP1 wurde im Labor Dr. Hänel (Abteilung Zell-und Molekularbiologie, HKI, Jena) im Rahmen eines Hefe Zweihybrid-Screens als Interaktionspartner von Miz1 identifiziert (Herold *et al.*, 2002). Erstmal wurde es jedoch durch seine Assoziation mit der Topoisomerase II β kloniert und beschrieben (Yamane *et al.*, 1997). Das humane TopBP1-Protein zeichnet sich durch den Besitz von acht BRCA1 Carboxy-terminalen (BRCT) Domänen aus. BRCT-Motive wurden ursprünglich in BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*) beschrieben (Koonin *et al.*, 1996) und sind seitdem in über 40 weiteren Proteinen gefunden worden (Bork *et al.*, 1997, Callebaut & Mornon, 1997). Proteine, die solche Motive enthalten, spielen häufig bei zellulären Prozessen wie der DNA-Reparatur (z.B. XRCC1, DNA Ligase III und IV, PARP-1) oder Zellzyklus-Kontrollpunkten (z.B. p53BP, Rad9) eine wesentliche Rolle. BRCT-Domänen bestehen typischerweise aus 80 bis 100 Aminosäuren und treten oft als Tandemstrukturen auf. Das Motiv wird durch Cluster konservierter hydrophober Aminosäuren definiert. Die dreidimensionale Struktur wurde durch Röntgenstrukturanalyse der C-terminalen BRCT-Domäne von XRCC1 aufgeklärt (Zhang *et al.*, 1998). Diese besteht aus vier parallelen β -Faltblattstrukturen als Kern, der von drei α -Helices umgeben ist. Über BRCT-Domänen werden Interaktionen zwischen Proteinen vermittelt (Huyton *et al.*, 2000). Verschiedene Studien zeigten, dass dabei spezifisch Phosphopeptide erkannt werden und BRCT-Domänen in der Lage sind, den Phosphorylierungsstatus ihrer Interaktionspartner zu unterscheiden (Yu *et al.*, 2003, Manke *et al.*, 2003, Rodriguez *et al.*, 2003). Die sechste BRCT-Domäne von TopBP1 bindet beispielsweise präferentiell phosphoryliertes E2F1 und BRCA1-BRCT-Domänen assoziieren nur mit phosphoryliertem BACH1 (Yu *et al.*, 2003, Rodriguez *et al.*, 2003). Es ist jedoch nicht geklärt, ob alle Interaktionen, die über BRCT-Domänen vermittelt werden, durch Phosphorylierungen reguliert werden und inwieweit diese Modifikation die Aggregation von Proteinkomplexen nach DNA-Schädigung beeinflusst. BRCT-Domänen binden auch DNA (Bork *et al.*, 1997). Im Fall von TopBP1 ist dies für die Domänen BRCT1-2 und BRCT6-8 gezeigt, welche an einzel- und doppelsträngige DNA sowie zirkuläre DNA mit Einzelstrangbrüchen binden (Yamane & Tsuruo, 1999).

TopBP1 weist Sequenz- und Strukturähnlichkeiten zu *Schizosaccharomyces pombe* Rad4/Cut5 auf (Mäkinen et al., 2001). Rad4/Cut5 ist ein *checkpoint* Rad-Protein, das an der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung und Replikationsstopps beteiligt ist (Saka & Yanagida, 1993, Saka et al., 1994, McFarlane et al., 1997, Marchetti et al., 2002). Mutationen dieser Allele führen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber UV- und γ -Bestrahlung (Saka et al., 1994).

Das homologe Protein von Rad4/Cut5 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist Dpb11 und enthält wie dieses vier BRCT-Domänen. Dieses Protein interagiert mit den replikativen Proteinen DNA Polymerase ϵ und Cdc45 sowie mit den *checkpoint*-Proteinen Ddc1 und Drc1 (Araki et al., 1995, Kamimura et al., 1998, Masumoto et al., 2000, Wang & Elledge, 2002). Es wird für die DNA-Replikation sowie den S-Phase *checkpoint* benötigt und ist wichtig für die Aktivierung der *checkpoint* Kinase Rad53 (Wang & Elledge, 1999).

In *Drosophila melanogaster* ist Mus101 (*mutagen-sensitive 101 protein*) das Homologe zu Rad4/Cut5 und Dpb11 der Hefen (Yamamoto et al., 2000). Es hat sieben BRCT-Motive, die über die gesamte Primärsequenz verteilt sind. Die Phänotypen einiger *MUS101*-Mutanten zeigen Hypersensibilität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen, Defekte bei der DNA-Synthese und Chromosomeninstabilitäten (Boyd & Setlow, 1976, Gatti et al., 1983, Yamamoto et al., 2000).

Das aus dem Nematoden *C. elegans* stammende, uncharakterisierte Protein F37D6.1 hat sechs BRCT-Domänen, die in drei Tandem-Wiederholungen angeordnet sind. Es ist zu 38% dem N-Terminus von TopBP1 ähnlich und zu 47% dem C-Terminus (Mäkinen et al., 2001).

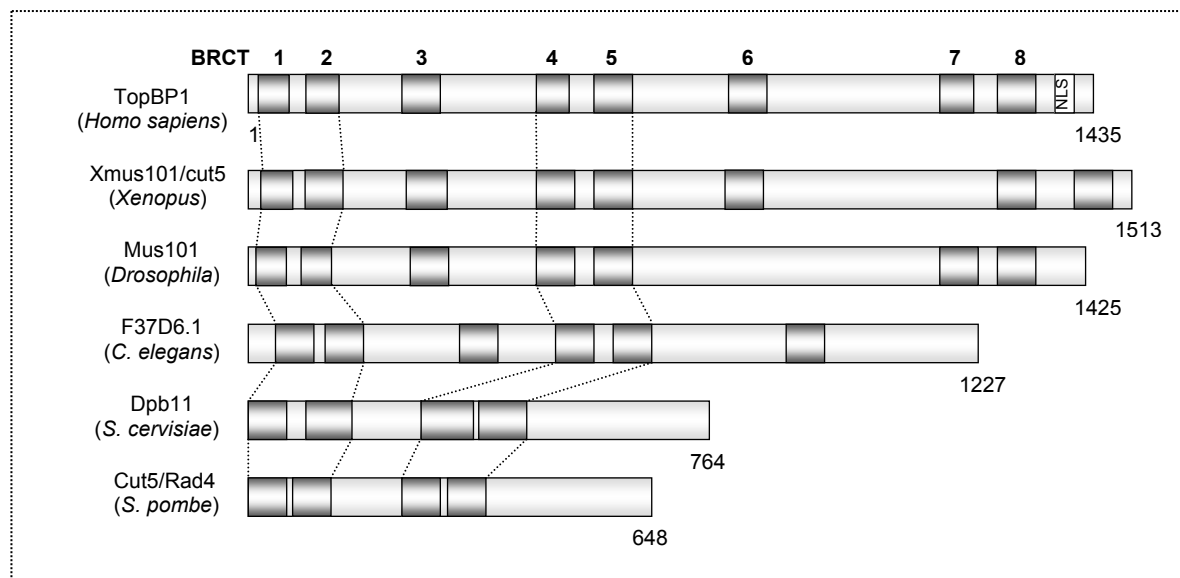


Abb.4: Schematische Darstellung von TopBP1, Xmus101/cut5, Mus101, F37D6.1, Dpb11 und Cut5/Rad4. NLS – nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal)

Auch aus *Xenopus* wurde mit Xmus101/cut5 ein Protein isoliert, dessen Aminosäuresequenz 75% Ähnlichkeit zu TopBP1 aufweist (Van Hatten *et al.*, 2002). Diesem Protein werden Funktionen bei der Initiation der replikativen DNA-Synthese zugesprochen (Van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003).

TopBP1 besitzt weder Enzymaktivität noch bekannte konservierte Enzymdomänen. Stattdessen zeichnet es sich durch Wechselwirkungen über seine BRCT-Domänen mit verschiedenen Proteinen aus. Dazu zählt das *checkpoint* Protein hRad9, das mit TopBP1 über die BRCT-Domänen 4-5 interagiert (Mäkinen *et al.*, 2001, Greer *et al.*, 2003). In Hefe bildet Rad9 zusammen mit fünf weiteren Proteinen (Rad1, Rad3, Rad17, Rad 26, Hus1) den *checkpoint Rad* Protein-Komplex, der für die Blockierung des Zellzyklus nach einer unvollständigen Replikation der DNA oder bei DNA-Schädigung verantwortlich ist (Al-Khodairy & Carr, 1992). Das menschliche Rad9 formiert mit hRad1 und hHus1 einen nukleären Komplex, der als Sensor für DNA-Schäden angesehen wird (St. Onge *et al.*, 1999).

Die BRCT-Domänen 5-6 sind für die Bindung von hHYD (*hyperplastic disc*) verantwortlich (Honda *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich um eine HECT-Domänen Ubiquitin-Ligase, auf die durch spezifische E2-Enzyme Ubiquitinmoleküle übertragen werden. Das resultiert in der Ubiquitinierung und dem anschließenden Abbau von TopBP1 durch das Proteasom. Die Phosphorylierung von TopBP1 nach γ -Bestrahlung und möglicherweise die Assoziation mit PML (*promyelocytic leukemia protein*) reduzieren diesen Vorgang und stabilisieren TopBP1 (Honda *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2003). PML ist wichtig für die Organisation von PML *nuclear bodies* und ist an der Regulation von Transkription sowie Apoptose beteiligt (Überblick in Borden, 2002).

Außerdem sind Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren beschrieben. Über die sechste BRCT-Domäne erfolgt die Phosphorylierungs-abhängige Bindung von E2F1 (Liu *et al.*, 2003). Indem TopBP Faktoren des Chromatin-modifizierenden Komplexes SWI/SNF (Brg1/Brm) rekrutiert, führt es zur Repression der E2F1-Aktivität (Liu *et al.*, 2004). Boner *et al.* (2002) zeigten, dass der Transkriptions- und Replikationsfaktor E2 von HPV16, wie die humane Topoisomerase II β (Yamane *et al.*, 1997) mit den BRCT-Domänen 6-8 assoziiert. Die C-terminalen BRCT-Domänen 7-8 sind für die Bindung und Repression von Miz1 in Abwesenheit von DNA-Schäden erforderlich (Herold *et al.*, 2002).

Die Interaktionsflächen von TopBP1 mit der DNA-Polymerase ϵ (Mäkinen *et al.*, 2001), 53BP1 (Yamane *et al.*, 2002) und PML (Xu *et al.*, 2003) wurden bisher noch nicht eingegrenzt.

Tab. 1: Die Protein-Protein-Interaktionen von humanem TopBP1, n.f.: nicht festgestellt

TopBP1-Domäne	Partner	Experimententyp	Referenz
BRCT4-5	hRad9	<i>in vitro</i>	Mäkinen et al., 2001
		<i>in vivo</i>	Greer et al., 2003
BRCT5-6	hHYD	<i>in vitro/in vivo</i>	Honda et al., 2002
BRCT6	E2F1	<i>in vitro/in vivo</i>	Liu et al., 2003
BRCT6-8	HPV 16 E2	<i>in vitro/in vivo</i>	Boner et al., 2002
	Topo II β	<i>in vitro</i>	Yamane et al., 1997
BRCT7-8	Miz1	<i>in vitro/in vivo</i>	Herold et al., 2002
n.f.	53BP1	<i>in vitro/in vivo</i>	Yamane et al., 2002
n.f.	Pol ϵ	<i>in vivo</i>	Mäkinen et al., 2001
n.f.	PML	<i>in vivo</i>	Xu et al., 2003
n.f.	Brg1/Brm	<i>in vivo</i>	Liu et al., 2004

TopBP1 ist Substrat der ATM Kinase und wird direkt nach γ -Bestrahlung oder Replikationsstress phosphoryliert (Yamane et al., 2002). Außerdem kolokalisiert TopBP1 nach DNA-Schädigung mit Foci, die blockierte Replikationsgabeln repräsentieren und mit Proteinen, die für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wichtig sind. Dazu zählen z.B. PCNA, PML, hRad9, BLM, ATM, ATR, BRCA1, NBS, 53BP1 und γ -H2AX (Mäkinen et al., 2001, Yamane et al., 2002, Honda et al., 2002, Jurvansuu et al., 2005, Xu et al., 2003, Greer et al., 2003, Perera et al., 2004). Während der Mitose ist TopBP1 zusammen mit BRCA1 in den Zentrosomen nachweisbar und in der meiotischen Prophase assoziiert es mit dem Axialkern und dem XY-Chromosomenpaar (Reini et al., 2004, Perera et al., 2004).

Aufgrund der Vielzahl von Interaktionen wird TopBP1 mit der DNA-Replikation und den Zellzykluskontrollpunkten am G1/S- und G2/M-Übergang sowie dem *checkpoint* im Rahmen der meiotischen Rekombination in Verbindung gebracht. Es wird angenommen, dass dieses Protein eine Rolle bei der Koordination und Regulation dieser Prozesse übernimmt, möglicherweise vergleichbar mit BRCA1.

Der genomische Locus des *TOPBP1*-Gens konnte durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung dem Chromosom 3, Region q21-q23 zugewiesen werden. Diese Region ist bisher nicht mit genetischen Veränderungen bei Tumorerkrankungen assoziiert worden (Mäkinen et al., 2001).

1.3 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Prozess, bei dem 21-23 bp lange Oligonukleotide doppelsträngiger RNA den sequenzspezifischen Abbau einer zur dsRNA komplementären RNA bewirken. Dieser Vorgang gehört zum so genannten *post transcriptional gene silencing* (PTGS), da dabei die Neusynthese von Proteinen nach der Transkription durch den Abbau bereits transkribierter und gespleißter mRNA verhindert wird (Abb.4).

RNAi wird durch eine ATP-abhängige Spaltung der dsRNA in kleine siRNAs (*small interfering RNAs*) eingeleitet (Zamore *et al.*, 2000, Hammond *et al.*, 2000, Bernstein *et al.*, 2001). Dafür ist das Enzym *Dicer* verantwortlich, eine RNase-III-ähnliche, dsRNA-spezifische Endonuclease (Bernstein *et al.*, 2001a,b, Hammond *et al.*, 2001).

Diese siRNA-Duplices werden in einen Multiproteinkomplex, den *RNA induced silencing complex* (RISC), integriert. Dort kommt es zur ebenfalls ATP-abhängigen Entwindung der doppelsträngigen siRNAs. Anhand des Antisense-Stranges der siRNA erkennt der RISC-Komplex dann die dazu komplementäre mRNA und spaltet diese spezifisch durch enzymatische Hydrolyse (Nykanen *et al.*, 2001, Martinez *et al.*, 2002).

RNAi ist unter Eukaryoten evolutionär konserviert. Entdeckt wurde dieser Prozess im Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Durch die Injektion von dsRNA in den Wurm wurde das komplementäre Gen stillgelegt (Guo & Kempheus, 1995, Fire *et al.*, 1998). Vergleichbare Effekte wurden später auch in Pflanzen und *Drosophila* gefunden (Vance & Vaucheret, 2001, Kenderell & Carthew, 2000). Während in diesen Organismen große dsRNAs effektiv sind, führen in Säugerzellen dsRNAs, die länger als 30 bp sind, zu antiviralen Abwehrmechanismen und unspezifischer Degradation von RNA-Transkripten (Baglioni & Nilsen, 1983). Diese Problematik konnte durch die Verwendung von synthetischen ca. 21-nt siRNAs umgangen werden (Elbashir *et al.*, 2001). Mittlerweile gibt es für die Einführung von siRNA in Säugerzellen Strategien, die auf DNA-Vektoren, Retroviren oder Adenoassoziierten- bzw. Lentiviren basieren. Diese haben den Vorteil, dass sie vergleichsweise geringe Kosten verursachen und nicht nur transient sondern auch über längere Perioden den Gen-*knock down* in Zellen bewirken können (Brummelkamp *et al.*, 2002, Sui *et al.*, 2002, Sen *et al.*, 2004, Robinson *et al.*, 2003). Außerdem sind durch die Konstruktion von RNAi-Bibliotheken Hochdurchsatz-Screens für phänotypische Studien möglich, um auf diese Weise neue Gene zu identifizieren, die an bestimmten Signalwegen beteiligt sind (Berns *et al.*, 2004, Shirane *et al.*, 2004).

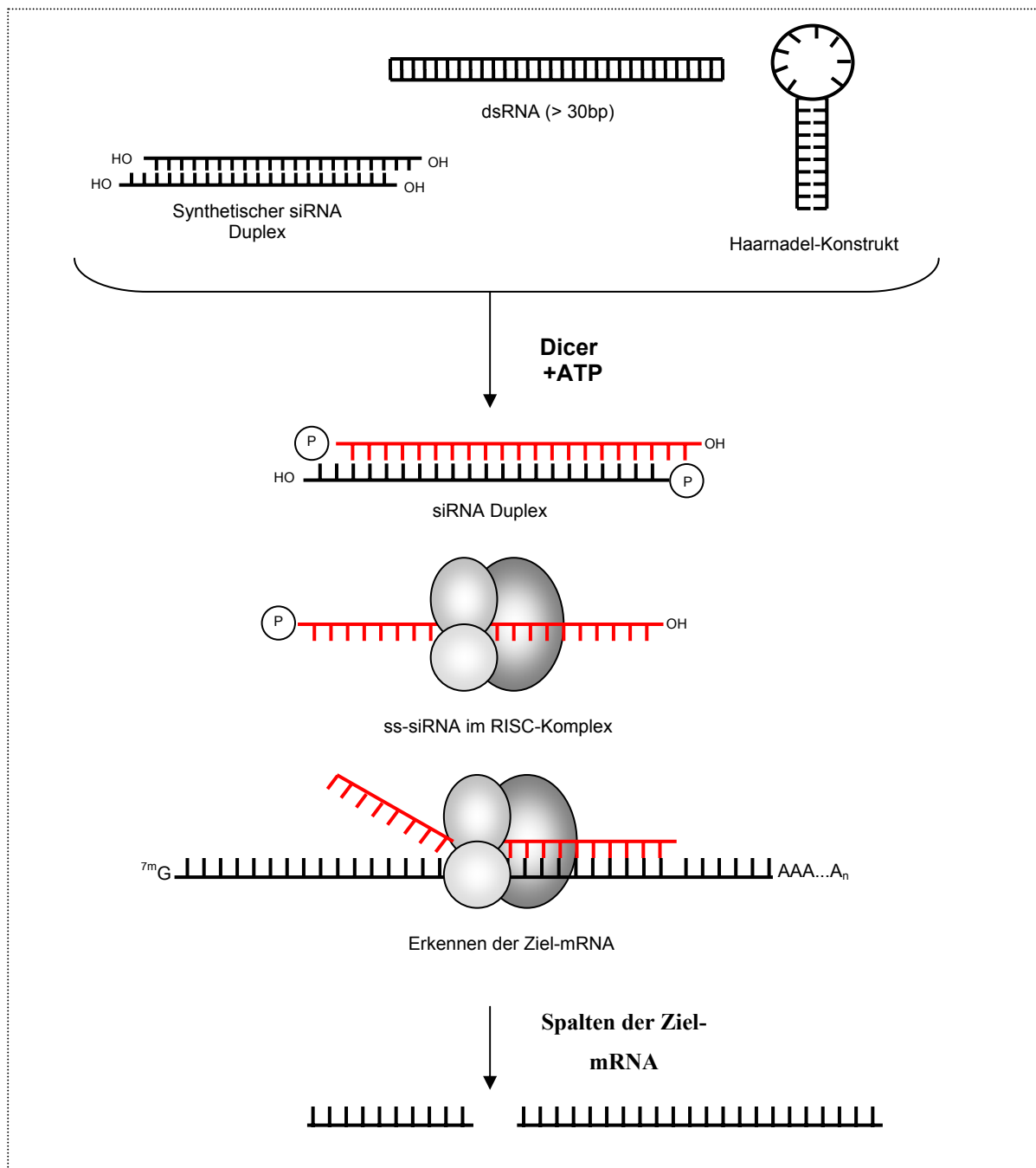


Abb. 4: Mechanismus der RNA-Interferenz.

Ausgehend von verschiedenen RNA-Strukturen werden kurze, ca. 21 bp große RNA-Duplices unter ATP-Verbrauch mit speziellen RNAsen vom Typ III (*Dicer*) gebildet. Die siRNA-Duplices werden in einen Proteinkomplex (RISC) integriert. Dieser erkennt die komplementäre Ziel-mRNA und spaltet sie, so dass die Translation des Proteins nicht mehr möglich ist.

Neben der phänotypischen Analyse von Zellen nach dem spezifischen *knock down* eines Gens, können Informationen zur funktionellen Charakterisierung dieses Gens auch durch Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Array gewonnen werden. Dabei ist es möglich den Transkriptionsstatus dieser Zellen zu bestimmen und mit Kontrollzellen, in denen das betreffende

Gen in normaler Stärke exprimiert wird, zu vergleichen. Dafür werden spezifische Sonden bekannter Sequenz in regelmäßiger Anordnung auf einem Chip/Array (Glasobjekträger) immobilisiert. Die zu messenden Proben (fluoreszenzmarkierte cDNAs) werden auf dem Array hybridisiert, wobei sie komplementäre Sonden binden. Nach dem Waschen sind die markierten Proben nur noch an ihren korrespondierenden Sonden spezifisch gebunden und können nach dem Scannen anhand der Fluoreszenzsignale quantifiziert werden. Werden Unterschiede in den molekularen Mengenverhältnisse verschiedener mRNAs zwischen Kontrollzellen und Gen-*knock down* Zellen festgestellt, können nach Identifikation und bei bekannter Funktion der betroffenen Gene Rückschlüsse auf eine Beteiligung des *knock down*-Gens an bestimmten Signalwegen möglich sein.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie bereits beschrieben wurde, ist TopBP1 an verschiedenen lebenswichtigen zellulären Prozessen beteiligt. Dazu zählen die DNA-Schadensantwort und die DNA-Replikation. Die dabei zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend von den strukturellen Eigenschaften und Besonderheiten von TopBP1 sowie unter Berücksichtigung bekannter Daten über dieses, homologe bzw. funktionell ähnliche Proteine, bislang unbekannte Protein-Protein-Interaktionen abzuleiten und näher zu charakterisieren.

Weiterhin sollte mit Hilfe von RNA-Interferenz die TopBP1-Expression in humanen Zellen gezielt abreguliert werden, um im Anschluss das Genexpressionsprofil und das Zellwachstum der TopBP1 *knock down*-Zellen mit Kontrollzellen, die normale TopBP1-Mengen aufwiesen, zu vergleichen. Diese Analysen sollten mit unbehandelten Zellen und mit Zellen, bei denen exogen DNA-Schäden induziert wurden, durchgeführt werden.

Mit diesen Untersuchungen sollten neue Aspekte für die Aufklärung der Funktion von TopBP1 bei der Regulation des Zellzyklus erbracht und in ein Modell des Myc-Miz1-Regulationsnetzwerks eingefügt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Die eingesetzten Lösungen sind gegebenenfalls autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar) oder steril filtriert und Glasgeräte hitzesterilisiert worden.

Für die Zellkultur wurden sterile Plastikmaterialien von Biochrom bezogen.

2.2 Material

2.2.1 Stämme und Zelllinien

Tab. 2: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft
DH5 α TM	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 phoA</i> \square F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻)	Invitrogen
BL21-Codon plus TM -RIL	<i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	Stratagene

Tab. 3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
HeLa	Humane Zelllinie eines zervikalen Adenokarzinoms mit integriertem HPV-18 (ATCC: CCL2)	M. Dürst, Frauenklinik, FSU Jena
HeLa S3	Klonales Derivat der parentalen HeLa-Linie, wächst adhärent als Monolayer oder in Suspension (ATCC: CCL-2.2)	C. Bauerschmidt, IMB Jena
Ls174T	Humane kolorektale Karzinomzelllinie, diploid, Wildtypallele von p53 (ATCC: CL-188)	M. Eilers, IMT Marburg

2.2.2. Vektoren und Plasmide

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Herkunft
pBluescript® KS+	P _{T7} , Klonierungs- und Sequenzierungsvektor	Stratagene
pcDNA3	P _{CMV} , Expressionsvektor für Säugerzellen	Invitrogen
pGADT7	P _{T7} , Zweihybridvektor	Clontech
pGEX-4T-1	<i>E. coli</i> Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine	Pharmacia
pGEX-4T-3	<i>E. coli</i> Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine	Pharmacia
pSUPER	Expressionsvektor für siRNA in Säugerzellen, Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002	R. Bernards, NCI, Amsterdam, Niederlande
pSUPER-TopBP1	Expressionsplasmid für TopBP1-siRNA	M. Wanzel, IMT, Marburg
pBABE-Puro	Morgenstern & Land, 1990	M. Eilers, IMT, Marburg
pBABE-GFP	pBABE-Puro modifiziert zur GFP-Expression	M. Eilers, IMT, Marburg
pRSET-Cdc45L	Saha <i>et al.</i> , 1998	C. Bauerschmidt, IMB, Jena
pBTM116-PARP-1	Masson <i>et al.</i> , 1998	C. Niedergang, ESBS, Illkirch, Frankreich
pGEX6p1-TopBP1	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid für GST-TopBP1 (AS 1-1435), Liu <i>et al.</i> , 2004	W.-C. Lin, Universität Alabama, USA
pFH158	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid für GST-TopBP1-BRCT6 (AS 807-916) basierend auf pGEX-4T-1	F. Hänel, HKI, Jena
pFH160	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid für GST-TopBP1-ctr. (AS 935-1058) basierend auf pGEX-4T-1	F. Hänel, HKI, Jena
pSH29	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid für GST-TopBP1-BRCT6-8 (AS 774-1320) basierend auf pGEX-4T-3	F. Hänel, HKI, Jena
pWY10	Fragment Cdc45L aus pRSET-Cdc45L, <i>XhoI/BamHI</i> in pGADT7	diese Arbeit
pWY12	PCR-Fragment PARP-1 _{DBD-AD} (AS 1-524), Primer PARP1/PARP2, <i>BamHI/XhoI</i> in Bluescript KS+	diese Arbeit
pWY13	PCR-Fragment Primer PARP1/PARP2, <i>BamHI/XhoI</i> in pcDNA3	diese Arbeit

pWY14	PCR-Fragment Primer PARP1/PARP3, <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I in Bluescript KS+	diese Arbeit
pWY15	PCR-Fragment Primer PARP1/PARP3, <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I in pcDNA3	diese Arbeit

2.2.2 Klonierungsprimer

Tab. 5: Verwendete PCR-Primer mit Restriktionserkennungsstellen

Primer	Sequenz (Restriktionsenzym)
PARP1	5'-GCGGATCCAATGGCGGAGTCTTCGGATAAG (<i>Bam</i> HI)
PARP2	5'-GCCCTCGAGCAGAATCAGGATCCACAGCTG (<i>Xho</i> I)
PARP3	5'-GCCCTCGAGGGAGGGCGGAGGCGTGGCCGC (<i>Xho</i> I)

2.2.4 Medien

2.2.4.1 Medien zur Anzucht und Kultur von Bakterien

Luria Broth-Medium (LB):	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl
LB _{Amp} -Medium:	LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin
LB _{Kana} -Medium:	LB-Medium; 10 µg/ml Kanamycin
LB _{Chloramphenicol} -Medium:	LB-Medium; 30 µg/ml Chloramphenicol
LB-Agarplatten:	1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB; pH 7,5
SOC-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 10 mM MgSO ₄ ; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 20 mM Glucose

2.2.4.2 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glucose, Pyruvat, Glutamax™ I

Zusätze für komplettes DMEM-Kulturmedium: 10% FCS

100 U/ml Penicillin/ 100µg/ml Streptomycin

RPMI 1640 mit Glutamax™ I

Zusätze für komplettes RPMI 1640-Medium: 10% FCS
100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin

2-fach konzentriertes Einfriermedium: 40 % (v/v) DMEM oder RPMI 1640
40% (v/v) FCS
20% (v/v) DMSO

2.2.5 Stammlösungen

Ammoniumpersulfat (APS)	10% (w/v) in A.bidest.
Antifade	1 Volumenteil <i>p</i> -Phenylendiamin (10 mg/ml in PBS) und 9 Volumenteile Glycerin mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt
Bradfordlösung	100 mg/l Coomassie Brilliantblau; 50 ml/l 95% Ethanol; 100 ml/l 85% Phosphorsäure in A.bidest.
DAPI	0,1 mg/ml in A.bidest.
10 mM dNTP-Mix	je 20 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP (100 mM Stammlösung) auf 920 µl A.bidest.
1 M DTT	3,085 g DTT in 20 ml A.bidest.
0,5 M EDTA	93,06 g EDTA in 500 ml A.bidest, pH 8,0 mit NaOH eingestellt
Ethidiumbromid	10 mg/ml in A. bidest.
Giemsa-Lösung	0,1% (w/v) Kristallviolett; 0,2 Volumenteile 95% EtOH in A. bidest.
0,1 M IPTG	25 mg/ml in A.bidest.
Lösung I	25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose
Lösung II	0,2 N NaOH; 1% (w/v) SDS
Lösung III	7,5 M Na-Acetat
Natrium- <i>ortho</i> -vanadat	10 mM in A.bidest.
Paraformaldehydlösung	3,8% (w/v) in PBS
Perfect-Block	30% (w/v) in A.bidest.
Propidiumiodid-Lösung (50x)	2 mg/ml Propidiumiodid in 38 mM NaCitrat; pH 7,0

Propidiumiodid/RNase A-Lösung	40 µg/ml Propidiumiodid; 250 µg/ml RNase A in PBS
Proteaseinhibitoren: Aprotinin	1 mg/ml in A.bidest.
Leupeptin	1 mg/ml in A.bidest.
Pepstatin	1 mg/ml in Methanol
PMSF	100 mM in Isopropanol
Proteingelentfärber	40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Proteingelfärbelösung	40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,2% (w/v) Coomassie Brilliantblau G250
RNase A-Lösung:	100 mg/ml in A.bidest.
Strip-Lösung	62,5 mM Tris; 2% (w/v) SDS; 100 mM 2-Mercaptoethanol; pH 6,8
100% (w/v) TCA	500 g TCA auf 227 ml A.bidest.
TFB I	30 mM K-Acetat (pH 6,0); 50 mM MnCl ₂ ; 100 mM KCl; 10 mM CaCl ₂ ; 15% (v/v) Glycerin
TFB II	10 mM MOPS (pH 7,0); 10 mM KCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15% (v/v) Glycerin
200 mM Thymidinlösung	2,42 g in 50 ml PBS

2.2.6 Puffer

Anodenpuffer für Tricin-Proteingele	200 mM Tris, pH 8,9
Kathodenpuffer für Tricin-Proteingele	100 mM Tris; 100 mM Tricin; 0,1% (w/v) SDS
Gelpuffer für Tricin-Proteingele	3 M Tris (pH 8,45); 0,3% (w/v) SDS
Proteingelladepuffer (2x)	5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8); 4 ml 20% SDS; 1 ml 2-Mercaptoethanol; 4 ml 50% Glycerin; 0,004 g Bromphenolblau; 6 ml A.bidest.
Tris-Glycin-Gellaufpuffer (1x)	33 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
Tris-Glycin-Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4% (w/v) SDS
Tris-Glycin-Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4% (w/v) SDS
Towbin-Puffer	3 g Tris; 14,4 g Glycin; 40% (v/v) Methanol
HB-Puffer	20 mM HEPES (pH 7,8); 100 mM KCl; 5 mM MgCl ₂
Zell-Lysepuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris (pH 8,0); 0,25% (v/v) NP-40

Puffer A für Zellfraktionierung	10 mM HEPES (pH7,9); 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ , 0,34 M Saccharose, 10% Glycerin, 1 mM DTT
Puffer B für Zellfraktionierung	3 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 1 mM DTT
DEAB-Puffer (5x)	27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA; 18 g Diethanolamin ad 1 l A.bidest.
DEPC-H ₂ O	2 ml DEPC auf 1 l A.bidest.
Glutathionelutionspuffer	10 mM Glutathion _{reduziert} ; 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
MOPS-Puffer (10x)	41,85 g MOPS; 6,8 g Na-Actetat-3H ₂ O; 20 ml DEPC behandelte 0,5 M EDTA-Lösung; pH 7,0 mit 10 M NaOH einstellen, auf 1 l DEPC-H ₂ O
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl; 26,8 g Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O; 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l A.bidest.; pH 7,4
DNA-Ladepuffer (4x)	3 ml 87% Glycerin; 0,25 ml 20% SDS; 1 ml 0,5 M EDTA; 0,2% (w/v) Bromphenolblau ad 10 ml A. bidest.
RNA-Probenpuffer	10 ml Formamid; 3,5 ml 37% Formaldehyd; 1 ml 10x MOPS (2:1 einsetzen)
RNA-Ladepuffer (10x)	50% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 0,4% (w/v) Bromphenolblau in DEPC-H ₂ O
SSC (20x)	3 M NaCl; 0,3 M Na ₃ Citrat, pH 7,0
TBS (1x)	50 mM Tris; 150 mM NaCl, pH 7,5
TBS-T (1x)	1 ml Tween-20 in 1 l TBS
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris; 100 ml 0,5 M EDTA; 57,1 ml Eisessig auf 1 l A.bidest.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

2.2.7 Chemikalien

Glutathion-SepharoseTM4B, [³⁵S]Methionin (**Amersham Pharmacia**)

Fötale Kälberserum (FCS), Penicillin/Streptomycin, Trypanblau, Trypsin/EDTA (**Biochrom**)

Ammoniumpersulfat (APS) (**BioRad**)

Agarose, Hefeextrakt, Isopropylthio- β -D-galactosid (IPTG), Kanamycin, Lipofectamine™ 2000, RPMI-1640, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (**Invitrogen**)

Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Chloramphenicol, Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD)(**Roche**)

Bromphenolblau (**Chemapol**)

Bacto-Trypton (**Difco**)

Primer für die PCR (**MWG Biotech**)

Aceton, Borsäure, Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA), Coomassie®Brillantblau G250, Chloroform, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA), Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N'-tetraessigsäure (EGTA), Glucose, Glycin, Glycerin, Isopropanol, Kaliumacetat, Lithiumchlorid, Methanol, 2-Mercaptoethanol, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumazid, Natriumchlorid, Nonidet P-40 (NP-40), Phenol, Phenol/Chloroform, *o*-Phosphorsäure, Rotiphorese® Gel30 (30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1), Salzsäure (HCl), verschiedene Salze, Trichloressigsäure (TCA), TritonX-100, N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin (Tricin), Tris, Tween-20 (**Roth**)

Perfect-Block (**MoBiTec**)

Agar, Ampicillin Natriumsalz, Diethanolamin, Dimethylsulfoxid (DMSO), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Ethylenglycol-bis[β -aminoethylether]-N,N,N'-tetraessigsäure (EGTA), Igepal-CA630, Natrium-*o*-vanadat, 4',6-Diamino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI), 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES), Mineralöl, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), Paraformaldehyd, Protein G-Sepharose, *p*-Phenylendiamin, Propidiumiodid, reduziertes Glutathion, Thymidin (**Sigma-Aldrich**)

N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (**Serva**)

Adriamycin, Kristallviolett, Magermilchpulver, Puromycin-Dihydrochlorid (**Merck**)

2.2.8 Größenstandards

DNA-Größenstandard:	Lambda DNA/ <i>Eco</i> 47III/ <i>Eco</i> 911 (MBI Fermentas)
	pBR322 DNA/ <i>Alu</i> I (MBI Fermentas)
	50bp DNA Step Ladder (Promega)
Protein-Größenstandard:	Kaleidoskope Prestained Standard (BioRad)
	BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen)

2.2.9 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Roche)
Bovine Poly(ADP-ribose)Polymerase (Calbiochem™)
RNase A (Serva)
Restriktionsendonucleasen (Invitrogen)
Pfu Turbo® DNA Polymerase (Stratagene)
Pwo DNA Polymerase (PeqLab)
T4 DNA Ligase (Invitrogen)
Sawady Taq DNA Polymerase (PeqLab)
PowerScript™ Reverse Transcriptase (BD Clontech)

2.2.10 Filme, Filter und Geräte

CO₂-Brutschrank IG150 (Jouan)
Blotapparatur (BioRad)
Film X-OMAT™AR, XAR 5 (Kodak)
Film Hyperfilm™ ECL (Amersham)
Fluoreszenzmikroskop BX51 (Olympus), Kamera DP50 (Olympus), Software Analysis®
Geldokumentationsanlage und Software: GeneSnap (Syngene)
Gelelektrophoreseapparatur (BioRad)
Geltrockner SGD4050 (Savant)
Immobilon™-P (PVDF) Transfer Membran (Millipore)
Laborwaage (Sartorius)
Magnetrührer/Heizplatte IMAK®RCT (Janke&Kunkel)
Mikroskop Telaval 31 (Zeiss)
pH-Meter pH537 (WTW)
PCR-Gräte: RoboCycler™ 40 (Stratagene)

GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer)

Rotationsschüttler (Infors HT)

Rotator Rotamix RM1 (ELMI)

Schüttelwippe WT12 (Biometra)

Sonicator LABSONIC U (B.Braun)

UV/VIS-Spectrophotometer: DU®640 (Beckmann)

ND-1000 (NanoDrop®) Software: NanoDrop 2.4.7c

Sterile Arbeitsbank Faster BHA48 (Kendro)

Sterile Werkbank *LaminAir*® HB2448 (Heraeus)

Thermomixer 5436 (Eppendorf)

Zentrifugen: Biofuge *fresco* (Heraeus)

Sigma 3K18 (Sigma)

Sorvall®RC 5C *Plus* (Sorvall)

Scanner: GMS 418 Array Scanner, Genetic Microsystems (MWG Biotech AG)

2.2.11 Antikörper

2.2.11.1 Primärantikörper

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Antikörper	Klon	Bezugsquelle	Anwendung (Verdünnung)
Maus anti-GST	Monoklonal	Novagen	WB (1:10000)
Maus anti-PARP-1	4C10-5	BD Pharmingen	WB (1:2000), IP (2 µg/ml),
Maus anti-PARP-1	C-2-10	Oncogene	WB (1:100), IF (1:30)
Maus anti-Orc2	920-4-41	BD Pharmingen BD	WB (1:2500)
Maus anti-Mek2	96	Pharmingen	WB (1:2500)
Kaninchen anti-Cdk2	H-298	Santa-Cruz	WB (1:500)
Kaninchen anti-TopBP1	polyklonal	Novus	WB (1:10000), IP (1 µg/ml)
Kaninchen anti-TopBP1	polyklonal	AG Härtl, HKI Jena	WB (1:250), IF (1:50)
Kaninchen anti-PAR	polyklonal	BD Pharmingen	WB (1:2000)
Ratte anti-Cdc45	3G10	AG Große, IMB Jena	WB (1:10), IP (100 µl/Ansatz)

2.2.10.2 Sekundärantikörper

Tab. 7: Für diese Arbeit verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugation	Bezugsquelle	Anwendung (Verdünnung)
Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	HRP	Dianova	WB (1:10000)
Ziege anti-Maus IgG	HRP	Santa-Cruz	WB (1:2000)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	HRP	Dianova	WB (1:10000)
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	FITC	Dianova	IF (1:50)
Ziege anti-Kaninchen (H+L)	RRX	Dianova	IF (1:150)

2.2.12 Kits

NucleoSpin®Extraction Kit (BD Clontech)

NucleoBond®Plasmid Midi Kit, AX 100 und Maxi Kit AX 1000 (BD Clontech)

NucleoSpin® RNAII (BD Clontech)

TNT®T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)

ECL Plus Western Blotting Detection Kit (Amersham)

CyScribe Post-Labeling Kit (Amersham)

Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham)

2.3 Methoden

2.3.1 Bakterien-Zellkultur

E. coli-Zellen wurden nach Standardprotokoll, wie in Sambrook *et al.* (1998) beschrieben, kultiviert. Plasmid-DNA wurde im *E. coli*-Stamm DH5α amplifiziert. Rekombinante GST-Fusionsproteine wurden im Stamm BL21-Codon plus™-RIL exprimiert.

2.3.2 Transformation von *Escherichia coli* nach Hanahan (1983)

2.3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Als Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit dem *E. coli*-Stamm DH5α beimpft und über Nacht auf einem Rotationsschüttler bei 180 rpm und 37°C kultiviert. Für die Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium mit 10 mM KCl und 20 mM MgSO₄ versetzt, mit 1 ml Vorkultur beimpft und für 1,5 bis 2

Stunden (bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3) bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde zu 50 ml aufgeteilt und die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 2000 x g, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 15 ml TFB I-Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer zweiten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Bakterienpellet in 2 ml TFB II-Lösung aufgenommen und in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße zu 200 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die Glyzerinkulturen der kompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Jeweils 200 µl der Suspension wurde mit 10-20 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 2 min auf 42°C erwärmt (Hitzschock), für weitere 2 min auf Eis inkubiert und durch Zugabe von 800 µl LB-Medium vorsichtig gemischt. Der Transformationsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Verschiedene Volumina des Transformationsgemisches wurden auf selektivem Medium, dem entsprechende Antibiotika zugesetzt wurden, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (nach Birnboim & Doly, 1979). 2 ml einer Übernachtskultur wurden 5 min bei maximaler Geschwindigkeit einer Mikrozentrifuge sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Lösung I resuspendiert. Durch die Zugabe von 200 µl Lösung II und vorsichtigem Mischen wurden die Zellen innerhalb einer 5-minütigen Inkubation auf Eis lysiert. Danach wurden Proteine, chromosomale DNA und Lipide durch Zusatz von 200 µl Lösung III und Inkubation auf Eis für 5 min gefällt. Durch Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand vom weißen flockigen Niederschlag getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß mit 0,6 Volumen Isopropanol überführt und gemischt. Die gefällten Nucleinsäuren wurden abzentrifugiert (15 min, 11000 x g, 4°C) und das Pellet in 200 µl A.bidest. gelöst. Verbliebene Proteine wurden durch Zugabe von 200 µl 9 M LiCl für 20 bis 30 min bei -20°C ausgesalzen und durch eine weitere Zentrifugation unter gleichen Bedingungen sedimentiert. Die im Überstand enthaltenen Nucleinsäuren wurden mit 0,6 Volumen Isopropanol durch nochmalige Zentrifugation gefällt. Das Präzipitat wurde zunächst mit 70% Ethanol und danach mit 95% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl A.bidest. aufgenommen.

2.3.4 Präparationen von Plasmid-DNA in größeren Maßstäben (Midi- und Maxipräparation)

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (aus 25 ml bis 400 ml Kulturen) wurde mit Hilfe der NucleoBond AX100 oder AX1000 Kits von Clontech nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

2.3.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA

DNA-Sequenzierungen wurden unter der Verwendung des Thermo Sequenase™ Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (mit 7-deaza-dGTP) von Amersham Biosciences und des Li-cor 4000-Sequenzierers von MWG Biotech durchgeführt.

2.3.6 Bearbeitung von Plasmid-DNA (PCR, Klonierungen)

Der Verdau von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen, die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Ligationen, Dephosphorylierungen und andere enzymatische Reaktionen wurden nach Empfehlungen der Hersteller oder nach Sambrook *et al.* (1998) durchgeführt.

Zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente wurden PCR-Reaktionen in einem Volumen von 100 µl durchgeführt und als Matrize Plasmid-DNA verwendet. Der fertige Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die *Pwo*-Polymerase wurde erst am Ende des ersten Denaturierungsschrittes zugegeben.

Reaktionsansatz: 2 µl DNA (10-20 ng)
 1 µl *forward* Primer (100 pmol)
 1 µl *reverse* Primer (100 pmol)
 10 µl Desoxynukleotide (dNTPs 2 mM)
 10 µl 10x Reaktionspuffer
 2 U *Pwo*-Polymerase
 74 µl A.bidest.

Standard-PCR-Programm (im RoboCycler):

Erst-Denaturierung	96°C	10 min	1 Zyklus
Denaturierung	96°C	1 min	30 Zyklen
Primer-Anlagerung	60-68°C	1 min	
Verlängerung	72°C	1-2 min	
Komplettierung	72°C	10 min	1 Zyklus

2.3.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von Total-RNA aus Säugerzellen wurde mit dem Nucleospin® RNAII-Kit von BD Clontech durchgeführt. Es wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren. Die Ausbeute und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge im Spektrophotometer und durch Elektrophorese auf einem Agarosegel überprüft. Die in A.bidest. gelöste RNA wurde kurze Zeit bei -80°C tiefgefroren oder für längere Lagerzeiten zuvor in 1 Volumen 3 M NH₃-Acetat und 4 Volumen absolutem Ethanol gefällt.

2.3.8 Elektrophorese von RNA

Die verwendeten Lösungen wurden mit A.bidest. angesetzt, das mit 0,2% (v/v) DEPC über Nacht vorbehandelt und autoklaviert war. Die Gelkammer ist für 30 min mit einer 3%igen H₂O₂-Lösung behandelt und anschließend mit DEPC-A.bidest. gespült worden.

1,5 g Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht, das Gel mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und auf den gereinigten Gelschlitten gegossen. 0,5 µg RNA wurden in 2 Volumen Probenpuffer aufgenommen, mit Ladepuffer gemischt und im Gel aufgetrennt.

2.3.9 Versuche mit siRNA

2.3.9.1 Plasmidkonstruktion

Mit kurzen interferierenden RNAs (siRNA) ist es möglich, den sequenz-spezifischen Abbau komplementärer mRNA zu bewirken und damit die Expression von Genen gezielt zu unterdrücken. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit der pSUPER Vektor (pSUPER: *suppression of endogenous RNA*) und dessen Derivat pSUPER-TopBP1 nach Brummelkamp *et al.* (2002) verwendet. Die Oligonukleotide mit der 19-nt Zielsequenz für siTopBP 5'-AAGCTTGGCTGCAGAATTG-3' wurden über die in den Oligonukleotidsequenzen enthaltenen HindIII- und BglII-Stellen mit dem pSUPER-Vektor ligiert (siehe auch Abschnitt 3.2.1). Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Michael Wanzel (IMT, Marburg) zur Verfügung gestellt. Wichtig bei der Wahl der Zielregion für siRNAs ist, dass sie im Genom einmalig ist und nur im Zielgen vorkommt. Aus diesem Grund wurde die Sequenz einem Abgleich mit der Datenbank unterzogen (im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

2.3.9.2 DNA-Array-Experimente

Herstellung der Hybridisierungsproben

Um die Effekte einer verminderten Expression von TopBP1 auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden Ls174T-Zellen wie unter Abschnitt 2.3.11.2 beschrieben, mit den Vektoren pSUPER (als Kontrolle) bzw. pSUPER-TopBP1 sowie einem Vektor mit Resistenzgen (pBABE-Puro) transfiziert und mit Puromycin für 7-9 Tage selektioniert. Im Western Blot wurde beurteilt, in welchem Umfang die RNA-Interferenz die TopBP1-Expression supprimierte. Dazu wurden die resultierenden Filme eingescannt und densitometrisch mit dem Computerprogramm PCBAS 2.08e (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet. RNA wurde aus siRNA-behandelten Zellen isoliert, die auf Proteinebene eine mindestens um 80% reduzierte TopBP1-Expression verglichen mit Kontrollzellen aufwiesen. Es wurden zwei Experimente durchgeführt. In Experiment 1 wurden TopBP1*knock down*-Zellen (pSUPER-TopBP1) mit Kontrollzellen (pSUPER) verglichen. Dieses Experiment wurde dreimal mit jeweils unabhängigen Proben als Sandwich-Hybridisierung unter Verwendung von je zwei *Slides* durchgeführt. Die dritte Wiederholung beinhaltet einen Austausch der Farbstoffe (*dye-swap*), um Effekte ausschließen zu können, die auf Eigenschaften der unterschiedlichen Farbstoffe beruhen. Für Experiment 2 wurde ein Teil der Transfektanten vor der RNA-Isolation für 15 Stunden mit 1 µg/ml Adriamycin behandelt. Dieses Experiment wurde zweimal als Sandwich-Hybridisierung durchgeführt und beinhaltet ebenfalls einen Farbstoffaustausch zwischen dem Probenpaar.

Tab. 8: Darstellung des experimentellen Designs

Experiment (Replica)	Probenpaar	cDNA markiert mit		
		1	2	3
1 (3)	pSUPER	Cy3	Cy3	Cy5
	pSUPER-TopBP1	Cy5	Cy5	Cy3
2 (2)	pSUPER + Adriamycin	Cy3	Cy5	-
	pSUPER-TopBP1 + Adriamycin	Cy5	Cy3	-

Für die Herstellung von Cy3- und Cy5-markierter cDNA wurden 50 µg Total-RNA mit Hilfe des CyScribe Post-Labeling Kits (Amersham) nach Anweisung des Herstellers umgeschrieben. Das Protokoll beinhaltet eine cDNA-Synthesereaktion mittels Superscript II reverser Transkriptase, wobei Aminoallyl-dUTP eingebaut wird. Als Primer dienten Oligo-dT-Sequenzen. Die Ansätze wurden in sterilen PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Im weiteren Verlauf erfolgte das chemische Markieren der Aminoallyl-modifizierten cDNA unter Verwendung von CyDye NHS-Ester. Die Aufreinigung der cDNA und der fluoreszenzmarkierten Probe erfolgte jeweils mit dem

QiaQuick PCR-Aufreinigungs-kit (Qiagen). Zu Beginn der Aufreinigung der markierten Proben, wurde ein Probenpaar (unterschiedlich markiert) einzeln auf die Säule pipettiert und gemischt. Nach der Aufreinigung wurden die Proben mit 20 µl Cot1-DNA (1 µg/µl) und 4 µl PolyA (5 µg/µl) versetzt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Proben wurden auf 26 µl eingeeengt, mit 10 µl 20x SSC und 4 µl 2% (w/v) SDS gemischt und für 2 min bei 95°C denaturiert.

Hybridisierung und Waschen

Als DNA-Array dienten Glasobjektträger (*Slides*) auf denen 11540 cDNAs als Einzelspots immobilisiert sind (Michael Krause, IMT, Marburg). Die *Slides* wurden für 30 min in Block-Reagenz (1% w/v BSA, 4,5x SSC, 0,1% w/v SDS) inkubiert, danach sofort in 200 ml A.bidest gewaschen und bei 500 x g für 3 min trocken zentrifugiert. Anschließend wurde der Probenmix (40 µl) auf das erste *Slide* pipettiert und das zweite *Slide* möglichst ohne Luftblasen aufgelegt. (Sandwich-Methode). Die Hybridisierung erfolgte in Falcon-Reaktionsgefäßen, welche ein mit 1,5 ml 3x SSC, 0,1% SDS getränktes Kinwipe-Tuch enthielten, bei 65°C für 16 h. Zum Waschen wurden die *Slides* aus dem Gefäß genommen, in 200 ml der ersten Waschlösung I (0,1x SSC, 0,1% SDS) voneinander getrennt, für 10 min bei RT geschwenkt und in 200 ml frische Waschlösung I überführt und nochmals für 10 min inkubiert. Danach wurden die *Slides* zweimal für je 5 min in 200 ml Waschlösung II (0,1x SSC) gewaschen, im Anschluß kurz in Wasser gespült und sofort trocken zentrifugiert.

Scannen und Datenanalyse

Die *Slides* wurden in einem konfokalem Laser-Scanner eingelesen (GMS 418 Array Scanner, MWG Biotech). Jede Hybridisierung wurde zuerst im Cy5-Kanal (Absorptionsmaximum = 649 nm, Fluoreszenzmaximum = 670 nm) und danach im Cy3-Kanal (Absorptionsmaximum = 550 nm, Fluoreszenzmaximum = 570 nm) gelesen. Die Daten-Analyse wurde mit dem Programm ImaGene™ durchgeführt. Jede Aufnahme wurde mit einem Grid überlagert, damit die Signalintensitäten jedes Spots bestimmt werden konnten. Die passenden Aufnahmen aus dem Cy5- und Cy3-Kanal wurden überlagert und die Daten (Signalintensitäten) extrahiert. Die Normalisierung (LOWESS) und statistische Auswertung der Daten wurde von Birgit Samans (Statistikerin am IMT, Marburg) durchgeführt.

2.3.9.3 RT-PCR

Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit der PowerScript™ Reverse Transcriptase (BD Clontech) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µg Gesamt-RNA mit DEPC-

behandeltem A.bidest. auf 10 µl aufgefüllt 1 µl (0,5 µg/ml) Oligo-dT(15)-Primer (Promega) zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und danach für 2 min auf Eis gestellt. Pro Reaktion wurden folgende Bestandteile eingesetzt: 11 µl RNA-Primer-Mix

4 µl 5x Erststrangsynthesepuffer

2 µl 100 mM DTT

2 µl 10 mM Desoxynukleotide (dNTPs)

1 µl PowerScript Reverse Transcriptase

Die Ansätze wurden für 70 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 15 min abgestoppt.

PCR zur spezifischen Amplifikation exprimierter Gene

Die PCR zur Verifikation differentiell exprimierter Gene wurde in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Dabei wurden pro Ansatz 1 U Taq-Polymerase (Peq-Lab) verwendet. Es wurde der vom Hersteller gelieferte PCR-Puffer verwendet sowie 0,2 mM Desoxynukleotide und 10 pmol des 5'- und 3'- Oligonukleotids. Außerdem wurde 1 µl aus dem RT-Ansatz zugegeben. Die Ansätze durchliefen folgendes Temperaturprogramm (die Temperatur für die Primeranlagerung wurde jeweils den Primern angepaßt):

Erst-Denaturierung	95°C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	1 min	25-35 Zyklen
Primeranlagerung	54-59°C	1 min	
Verlängerung	72°C	1 min	
End-Verlängerung	72°C	10 min	1 Zyklus

Zur Analyse wurden Aliquots von 10 µl auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Primer 3 Software (entwickelt von S. Rozen, H.J. Skaletsky, 1996, erhältlich unter http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html) bestimmt und von MWG Biotech synthetisiert.

Tab. 9: Oligonukleotide für die semiquantitative PCR

Primer	Sequenz
S14for	5'-GGCAGACCGAGATGAATCCTC-3'
S14rev	5'-CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC-3'
GapDHfor	5'-CGGGAAGCTTGTGATCAATGG-3'
GapDHrev	5'-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3'
Citsynfor	5'-TGCCCCTTCTGTTTCCATAG-3'
Citsynrev	5'-GGTGCCAGTCACAACAAATG-3'

PolR2for	5'-CTCAGGGTCATCTTCCCAAC-3'
PolR2rev	5'-CCAGCTTCTTGCTCAATTCC-3'
Rab6Afor	5'-CCC GACTTCCTCAAAACAAA-3'
Rab6Arev	5'-GCCTACCATGATGGCTGAAT-3'
Nucleolinfor	5'-GACGAGGTGGTGGTAGAGGA-3'
Nucleolinrev	5'-CAAATGGAAAAGGGAAAGCA-3'
Aldocfor	5'-ACTCCATACCACAGCCCTTG-3'
Aldocrev	5'-GCAATTTCTTCTGCCCTCAG-3'
H1F0for	5'-CTTTCGGCCTCCCTATTTTC-3'
H1F0rev	5'-TTTCAACAGGGCACACTGAG-3'
Hspe1for	5'-AGGGAGTAATGGCAGGACAA-3'
Hspe1rev	5'-TCCACCCTTTCCTTTAGAACC-3'
Kit1for	5'-TTCTGTGCGGATCAATTCTG-3'
Kit1rev	5'-CCC ACTATCCTGGAGTTGGA-3'

2.3.9.4 Zellwachstumsversuche

Ls174T-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit pSUPER-TopBP1 oder pSUPER (als Kontrolle) und dem Puromycin-Resistenzgen transfiziert. Dafür wurden für Ls174T-Zellen die Lipofektion (2.3.11.2) und für HeLa-Zellen die Kalziumphosphat-Präzipitation (2.3.11.1) als Transfektionsmethode angewandt. Die Zellen wurden für 8 Tage selektioniert und die reduzierte TopBP1-Expression der siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen im Western Blot überprüft. Die Puromycin-resistenten Zellen wurden auf 6 cm Platten oder 6-Well Platten (5×10^4 Zellen pro Platte bzw. Vertiefung) ausgesäht. Am folgenden Tag wurde ein Teil der Ls174T-Zellen für eine Stunde mit $1 \mu\text{g/ml}$ Adriamycin inkubiert. HeLa-Zellen wurden analog dazu mit 500 J/m^2 UV-B bestrahlt. Die Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen. Jeden vierten Tag wurde das Medium erneuert. Nach vierzehn Tagen wurden die Zellen durch eiskaltes Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt.

2.3.10 Zellkultur eukaryotischer Zelllinien

HeLa und HeLa S3 wurden adhärent als Monolayer auf Plastikgewebekulturplatten oder -flaschen kultiviert. Als Kulturmedium diente DMEM mit Glutamax ITM komplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min) und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin ($100 \mu\text{g/ml}$).

Ls174T-Zellen wurden adhärent in RPMI-1640 mit Glutamax ITM, supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml) gehalten. Die Zellen

wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% w/v Trypsin/2 mM EDTA) abgelöst. In regelmäßigen Intervallen wurden die Kulturen mittels DAPI-DNA-Färbung fluoreszenzmikroskopisch auf Mycoplasmen-Kontaminationen gescreent.

2.3.11 Transfektion eukaryotischer Zellen

2.3.11.1 Kalziumphosphat-Präzipitation (nach Wigler *et al.*, 1978)

Transiente Transfektionen von HeLa-Zellen wurden nach der Kalziumphosphat-Methode durchgeführt. Die Menge der transfizierten DNA richtete sich nach der Größe des Kulturgefäßes. Pro cm² Kulturschale wurden 2 µg DNA eingesetzt. Zu jedem DNA-Ansatz wurden 50 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde mit A.bidest. auf 250 µl aufgefüllt. Die Präzipitatbildung wurde durch tropfenweise Zugabe des DNA-Ansatzes zu 250 µl 2x HBS-Puffer unter gleichzeitigem Einblasen von Luft mit einer Pasteurpipette ausgelöst. Der Transfektionsansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach in das Kulturmedium der 50-60% konfluenten Zellen pipettiert und verteilt. Nach 12 Stunden wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen weitere 24 Stunden inkubiert.

2.3.11.2 Lipofektion

Ls174T-Zellen wurden stabil mit Lipofectamine™ 2000 nach Anleitung des Herstellers transfiziert. Dazu wurden die Zellen einen Tag zuvor auf 10 cm Platten ausplattiert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 90% konfluent waren. Es wurden 25 µg DNA eingesetzt. Das Verhältnis von Expressions- (pSUPER bzw. pSUPER-TopBP1) und Selektionsvektor (pBABE-Puro) betrug 10:1. Am folgenden Tag wurden die Zellen 1:4 gesplittet und mit 1 µg/ml Puromycin versetzt um stabile Zelllinien zu erhalten.

2.3.12 Synchronisation von HeLa-Zellen mittels doppeltem Thymidinblock

Thymidindesoxyribose oder kurz Thymidin (TdR) wurde benutzt, um HeLa S3-Zellen im Zellzyklus zu synchronisieren. Damit Zellen in der S-Phase ihre DNA replizieren können, müssen dNTPs hergestellt werden. Die Ribonukleotid-Reduktase ist dabei ein Schlüsselenzym. Es wandelt Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide auf der Stufe der Diphosphate um. Die dabei entstehenden dNDPs werden zu dNTPs aufphosphoryliert. Die Ribonukleotid-Reduktase kann durch einige dieser Endprodukte gehemmt werden (feedback-Hemmung). Hohe Konzentrationen an TdR

hemmen die Ribonukleotid-Reduktase durch das entstehende TTP bevor ausreichende Mengen der drei anderen dNTPs für die Replikation synthetisiert werden können. Die Folge ist ein Arrest der Zellen am G1-S-Übergang. Zellen in G2, M und G1 werden durch überschüssiges Thymidin nicht beeinflusst und durchlaufen den Zellzyklus bis sie den G1-S-Übergang erreichen, wo die einsetzende DNA-Synthese gehemmt wird. HeLa S3-Zellen wurden nach Bootsma *et al.* (1965), mit leichten Modifikationen, mittels doppeltem Thymidin (TdR)-Block synchronisiert. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert, als der erste TdR-Block erfolgte. Dazu wurde dem Kulturmedium 5 mM TdR zugesetzt. Nach 16 Stunden wurden die Zellen aus dem TdR-Block entlassen, indem das Medium entfernt und die Platten zweimal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen wurden. Dieses Medium wurde durch 20 ml Kulturmedium ersetzt und die Schalen für 10 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte der zweite TdR-Block durch wiederholte Zugabe von 5 mM TdR ins Kulturmedium. Weitere 16 Stunden später wurden die Zellen wie oben beschrieben aus dem Zellzyklus-Arrest entlassen. Die Zellen wurden direkt nach dem Entlassen (0h) und nach verschiedenen Zeitintervallen (1h, 3h, 6h, 9h, 12h,) geerntet. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einer PBS/0,05% EDTA-Lösung abgelöst und danach abzentrifugiert (500 x g, 5 min, 4°C) worden. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen, 0,5 ml dieser Zellsuspension wurden für die FACS-Analyse (siehe 2.3.13) abgenommen. Der Rest wurde nochmals zentrifugiert und für Zellfraktionierungen bzw. Immunpräzipitationen lysiert.

2.3.13 Durchflusszytometrie (Ormerod, 1994)

Die Passage von Zellen durch S-Phase und Mitose führt zu einem veränderten zellulären DNA-Gehalt. Aus diesem Grund kann die Position der Zellen im Zellzyklus durch die Messung ihres DNA-Gehalts nach Propidiumiodid-Färbung bestimmt werden. Für die FACS-Analyse wurden 0,5 ml Zellsuspension bei der Zellernte der Synchronisationsexperimente (2.3.12) abgenommen. Unter Vortexen wurden 3 ml eiskaltes Ethanol (99,8%) langsam zugetropft, um die Zellen zu vereinzeln und zu fixieren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung, mindestens aber eine Stunde bei 4°C aufbewahrt. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Propidiumiodid, welches in die DNA interkaliert. Dazu wurden die fixierten Zellen abzentrifugiert (500 x g, 5 min, 4°C) und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml einer frisch angesetzten Propidiumiodid (40 µg/ml)/RNase A (250 µg/ml)-Lösung resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Messung und Analyse der Färbung erfolgte mit einem FACS-Calibur und der dazugehörigen CellQuest Pro Software (beides Becton Dickinson). Um Artefakte, die durch die Probenaufbereitung entstehen können zu vermeiden, wurden Zelldupletten und größere Aggregate vor der Analyse ausgegated. Eine G1-Duplette besitzt den gleichen DNA-Gehalt wie eine einzelne

Zelle in der G2-Phase, erzeugt aber ein breiteres Lasersignal. Über die Darstellung der Peakbreite können Zellaggregate von Einzelzellen diskriminiert werden. Um die Grenzen der Zellzyklusphasen zu bestimmen, wurden nicht synchronisierte Zellen verwendet.

2.3.14 Analyse und Expression von Proteinen

2.3.14.1 Bestimmung der Proteinkonzentration und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Zelllysate wurde mittels der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford, 1976) bestimmt.

Die entsprechenden Proteinmengen wurden mit 2x Proteingelladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) oder nach Schagger und Jagow (1992), wobei sich der Polyacrylamidanteil des Gels nach dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins richtete. Als Referenz wurden vorgefärbte Proteingrößenmarker mit aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine im Gel mit Coomassie Brilliant-Blau G250 gefärbt oder im Western Blot analysiert. Zur Coomassiefärbung wurde das Gel für 30 min in Proteingelfärbelösung geschwenkt und anschließend mit Entfärbelösung so lange entfärbt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

2.3.14.2 Western Blot (nach Towbin *et al.*, 1979)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im *Semi-Dry*-Blotverfahren (BioRad) auf PVDF-Membran (Millipore) bei 4 mA/cm² für eine Stunde übertragen. Dazu wurden die Membran zunächst mit 100% Methanol benetzt (1 min), in A.bidest gespült (2 min) und zusammen mit dem Gel und Whatman-Papier in Towbin-Puffer getränkt.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Blot mit Blocklösung (5% (w/v) Milchpulver in TBS-T) über Nacht bei 4°C geblockt. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper in Blocklösung verdünnt und für 1-2 Stunden bei RT auf der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 15 min) mit TBS-T wurde die Membran mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in Blocklösung) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran viermal für je 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor die Detektion der Proteine durch *Enhanced Chemi-Luminescence* (ECLplus, Amersham) auf Hyperfilm (Amersham) erfolgte.

2.3.14.3 Stripping von Western-Blots

Um verschiedene Proteine auf einer PVDF-Membran zu detektieren, können Antikörper nach der ersten Färbung von der Membran mittels Strip-Lösung herunter gewaschen werden. Dazu erwärmt man den Blot in der Lösung auf 55°C für 30 min unter mehrmaligem Schwenken und wäscht ihn dann intensiv mit PBS. Die Membran kann von neuem blockiert und mit einer anderen Antikörperkombination gefärbt werden.

2.3.14.4 Bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen und deren Aufreinigung

Die jeweilige cDNA wurde in pGEX-Expressionvektoren im fortlaufenden Leserahmen mit der DNA-Sequenz für das Glutathion-S-Transferase-Gen kloniert. Für die Expression der Fusionsproteine wurden BL21 Codon Plus Bakterien verwendet. Es wurde eine 5 ml-Vorkultur beimpft und über Nacht geschüttelt (180 rpm, 37°C). 500 µl dieser Vorkultur wurden in 20 ml LB_{Amp}-Medium als Hauptkultur gegeben und für 2,5 Stunden geschüttelt (180 rpm, 37°C). Die Expression wurde mit 100 mM IPTG induziert und die Bakterien wurden für weitere 2 Stunden unter den gleichen Bedingungen geschüttelt. Für die Lyse wurden die Bakterien bei 2000 x g für 5 min abzentrifugiert, in 1 ml PBS mit Proteaseinhibitoren (0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT) aufgenommen und mittels Ultraschall (3x30 sec, 0,5 sec Impulse, medium Power, Labsonic U) aufgeschlossen. Die lysierten Zellen wurden für 30 min bei 4°C in 1% (v/v) Triton X-100 auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Aufreinigung der GST-Fusionproteine aus den Bakterienlysaten erfolgte als Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham) nach Empfehlung des Herstellers. In Abhängigkeit von den weiteren Versuchen, wurde das GST-Fusionsprotein an der Sepharose belassen oder mit Glutathionelutionspuffer eluiert.

2.3.14.5 In vitro Expression von Proteinen

Die für das jeweilige Protein kodierende cDNA wurde in einen Vektor kloniert, der in 5'-Position zum Insert einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase besitzt. Die DNA wurde durch Phenol/Chloroformextraktion gereinigt und in RNase-freies A.bidest aufgenommen. Es wurde ein *in vitro* Transkriptions/Translations-System von Promega (TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System) genutzt und nach den Anweisungen des Herstellers verfahren, wobei die Markierung der translatierten Proteine mit [³⁵S]-Methionin (Redivue™ L-[³⁵S]-Methionin, 1000 Ci/mmol, Amersham) erfolgte. Zur Kontrolle wurden die Reaktionsprodukte auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

2.3.14.6 *In vitro* Protein-Protein-Interaktionsassay

20 µg Glutathion-Sepharose gekoppeltes GST-Fusionsprotein oder GST als Kontrolle wurde mit 250 µl HBB/ 0,5% (v/v) NP-40/ 0,5 mM DTT gewaschen und in 50 µl HBB aufgenommen. Um auf eine spezifische Interaktion zu testen, wurden zu dem Ansatz 10 µl *in vitro* translatiertes [³⁵S]-Methionin markiertes Protein und 50 µl HBB/ 0,5% NP-40 gegeben. Die Proteine wurden 2 Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben viermal mit 300 µl HBB/ 0,5% NP-40 gewaschen. Für den letzten Waschschrift wurde der Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die gebundenen Proteine wurden in 20 µl Proteingelladepuffer bei 95°C für 5 min eluiert, in einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

2.3.14.7 *Pull-down-Assay* mit HeLa-Zellysaten

HeLa-Zellen wurden in NP-40-Lysepuffer 30 min auf Eis lysiert und Zelltrümmer abzentrifugiert (11000 x g, 15 min, 4°C). 300 µg Zellprotein pro Ansatz wurden mit GST-TopBP1-BRCT6 oder als Kontrollen GST und GST-TopBP1-ctr. (jeweils immobilisiert an Glutathionsepharose, hergestellt wie unter 2.3.14.4 beschrieben) gemischt und 2 Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Ansätze abzentrifugiert (1000 x g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Sepharose dreimal gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in Proteingelladepuffer bei 95°C für 5 min gekocht und durch eine 10%ige SDS-PAGE getrennt. Nach dem Blotten wurde PARP-1 detektiert.

2.3.14.8 Immunpräzipitation

Alle Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen. Die Zellen wurden von 15 cm-Kulturplatten abgeschabt, in PBS aufgenommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml isotonischen Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8,0), 0,25 % NP-40, Proteaseinhibitoren) resuspendiert, einmal in flüssigem Stickstoff schockgefroren, aufgetaut und 30 min auf Eis stehen gelassen. Durch eine 15-minütige Zentrifugation wurde das Zelltrümmer sedimentiert (11000x g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

Am Vorabend der Immunpräzipitation wurden pro Ansatz des Experiments 15 µl Protein-G-Sepharose mit Lysepuffer äquilibriert (Zentrifugationen bei 1200x g, 5 min, 4°C), die Sepharose in 300 µl Lyspuffer aufgenommen, mit 3% Perfect-Block (zum Absättigen der unspezifischen Bindekapazität) und 1-3 µg/ml spezifischen Antikörper versetzt. Die Ansätze wurden für die

Antikörperbindung an die Protein-G-Sepharose über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am Tag der Immunpräzipitation wurden die Ansätze zweimal mit Lysepuffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Das Zelllysate wurde zunächst mit äquilibriumierter und geblockter Protein-G-Sepharose für 30 min bei 4°C inkubiert (*Preclearing*), um unspezifisch bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Danach wurde die Sepharose abzentrifugiert und das Volumen an vorbehandeltem Zelllysate, was 1,0-1,2 mg Totalprotein entsprach, wurde zum Pellet aus der Antikörperkopplung gegeben (300 µl Gesamtvolumen). Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 4°C über Kopf rotiert. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand verworfen oder im Western Blot auf die Effizienz der Immundepletion überprüft und das Pellet dreimal mit 300 µl Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer möglichst vollständig entfernt und die gebundenen Proteine durch Kochen in Proteingeladepuffer (95°C, 5 min) von der Protein-G-Sepharose eluiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und der Überstand mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Antikörper oder mit Präimmunsereum.

2.3.14.9 Zellfraktionierung (nach Mendez und Stillman, 2000)

Zur Isolation von Chromatin wurden ca. 4×10^7 Zellen in PBS gewaschen und in 1 ml Puffer A mit Proteaseinhibitoren (5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 0,5 µg/ml Pepstatin und 0,2 mM PMSF) resuspendiert. Für die Zellyse wurde 0,1% nicht-ionisches Detergens (Triton X-100) zugesetzt, vorsichtig durch invertieren gemischt und die Suspension für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit (1300x g, 5 min, 4°C) wurden die Kerne als Pellet (P1) gesammelt. Der Überstand (S1) wurde nochmals bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert (11000x g, 30 min, 4°C), um Zelldebris und unlösliche Aggregate zu entfernen (Ergebnis: lösliche Zytoplasmafraktion S2). Die Zellkerne wurden zweimal in Puffer A gewaschen und anschließend hypotonisch in 200 µl Puffer B mit Proteaseinhibitoren für 30 min auf Eis aufgeschlossen. Das unlösliche Chromatin wurde durch Zentrifugation (1700x g, 5 min, 4°C) angereichert und der Überstand als lösliche Kernfraktion (S3) gesammelt. Das finale Chromatinangereicherte Pellet (P3) wurde einmal in Puffer B gewaschen und danach kurz mit Ultraschall behandelt. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels Western Blot (siehe 2.3.14.2) analysiert.

2.3.14.10 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden auf mikroskopischen Deckgläsern (12 mm Durchmesser) kultiviert. Die Deckgläser wurden in PBS gewaschen, in 24-Loch-Platten überführt und in frisch angesetzten 3,8 % Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Es wurde zweimal für 5 min mit PBS/0,1 M Glycin

gewaschen und die Zellen in 0,5% (v/v) NP-40 in PBS für 10 min permeabilisiert. Zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen, wurden die Zellen in Blocklösung (PBS/ 5% (v/v) FCS/ 0,1% (v/v) NP-40) für 30 min bis über Nacht bei RT inkubiert. Der Primärantikörper wurde in Blocklösung verdünnt und die Zellen damit für 1 Stunde bei RT behandelt. Anschließend wurde viermal mit 0,1% NP-40 in PBS gewaschen. Die Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper wurden ebenfalls in Blocklösung verdünnt und DAPI als DNA-Farbstoff (1 µg/ml) zugesetzt. Die Zellen wurden damit 1 Stunde inkubiert, dreimal mit 0,1% NP-40 in PBS und einmal mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden kurz in A.bidest. getaucht, luftgetrocknet und mit Antifade eingedeckt. Digitale Aufnahmen wurden unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops BX51, der Kamera DP50 (beides Olympus) und dem Programm Analysis® erzeugt.

2.3.15 In vitro Poly(ADP-ribosyl)ierungs-Assay modifiziert nach Ferro & Olivera (1982)

Die oligo(ADP-ribosyl)ierung von TopBP1-Fragmenten wurde untersucht, indem GST (400 ng), GST-TopBP1-ctr. (400 ng), GST-TopBP1-BRCT6 (200 ng, 400 ng, bzw. 600 ng) und GST-TopBP1-BRCT6-8 (200ng, 400 ng bzw. 600 ng) zusammen mit rekombinantem PARP-1 (200 ng) in einem 40 µl Reaktionsansatz (50 µM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM MgCl₂; 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 3 µg aktivierte Kalbsthymus-DNA sowie 200 µM NAD⁺) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-PAGE-Ladepuffer und Denaturierung bei 95°C für 5 min terminiert. Die gesamten Ansätze wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot nacheinander mit anti-PAR, anti-GST und anti-PARP analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Funktionelle Untersuchungen von TopBP1: Identifizierung neuer Interaktionspartner

TopBP1 enthält acht BRCT-Domänen – mehr als jedes andere bekannte humane Protein.

BRCT-Domänen gelten als konservierte Interaktionsflächen von funktionell verwandten Proteinen miteinander (Bork *et al.*, 1997, Callebaut & Mornon, 1997, Huyton *et al.*, 2000) oder für die Assoziation von Proteinen mit DNA (Fotedar *et al.*, 1996, Yamane & Tsuruo, 1999). Über phosphorylierte Reste erkennen und binden sie ihre physiologischen Partnerproteine (Manke *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2003).

Ausgehend von den strukturellen Eigenschaften von TopBP1 und unter Berücksichtigung bekannter Daten über dieses und ähnliche Proteine aus anderen Organismen, sollten in dieser Arbeit bisher unbekannte Interaktionen abgeleitet und näher untersucht werden.

3.1.1 Präsenz einer potentiellen poly(ADP-Ribose)-Bindestelle innerhalb des TopBP1 Proteins

Sequenzanalysen haben gezeigt, dass TopBP1 innerhalb der sechsten BRCT-Domäne eine Proteinregion besitzt, die homolog zur Auto-(ADP-Ribosyl)ierungsdomäne der Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP-1) ist (Yamane *et al.*, 1997). Dieses Enzym modifiziert verschiedene nukleäre Proteine durch Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Die Untersuchung bedeutender *DNA damage checkpoint* Proteine, wie z.B. p53, p21^{CIP1}, XRCC1, DNA Ligase III, NF-κB, Ku-70, welche Substrate von PARP-1 sind, führte zur Identifizierung eines Poly(ADP-Ribose)-bindenden Sequenzmotivs (Schmitz *et al.*, 1998, Pleschke *et al.*, 2000).

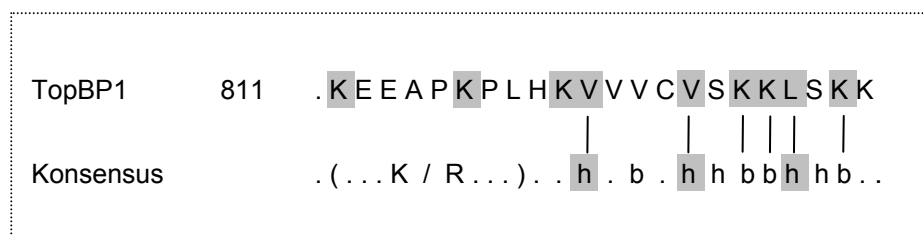


Abb.5: Identifizierung einer potentiellen PAR-Bindestelle innerhalb der sechsten BRCT-Domäne von TopBP1

Die Konsensussequenz beginnt am N-Terminus mit einem oder mehreren basischen Aminosäureresten (Lysin oder Arginin) gefolgt von eingestreuten basischen (*b*) und hydrophoben (*h*) Resten. Die Sequenz von TopBP1-BRCT6 zeigt das gleiche Muster der Verteilung der Aminosäuren: an N-terminale basische Reste (K/Lysin) schließen sich stromabwärts hydrophobe Reste (V/Valin, L/Leucin), die von basischen Aminosäuren (K/Lysin) unterbrochen sind.

Ein typisches Motiv umfasst 20 Aminosäuren und enthält zwei konservierte Regionen: i) eine Ansammlung basischer Aminosäurereste und ii) ein Muster von hydrophoben Aminosäuren, zwischen denen sich basische Reste befinden. Dieses PAR-Bindemotiv konnte auch im N-terminalen Bereich der sechsten BRCT-Domäne von TopBP1 gefunden werden.

3.1.2 *In vitro* Interaktion von TopBP1 und PARP-1

Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen der sechsten BRCT-Domäne von TopBP1 und der Auto-Modifikationsdomäne (AD) von PARP-1 sowie der Existenz eines PAR-Bindungsmotivs innerhalb derselben BRCT-Domäne, sollte untersucht werden, ob beide Proteine direkt miteinander interagieren. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden verschiedene *in vitro* Interaktionsassays in Form von GST-Pull down Experimenten durchgeführt. Solche Experimente beruhen auf der Immobilisierung eines GST-Fusionsproteins an Glutathion-Sepharose und der Inkubation mit einem potentiellen Interaktionspartner. Dazu kann der Interaktionspartner durch den Einbau von radioaktivem Schwefel markiert werden. Der gebildete Proteinkomplex wird nach mehrmaligem stringentem Waschen durch Hitzedenaturierung gelöst, gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Wird der Interaktionspartner in ausreichender Menge in Zellen exprimiert, besteht außerdem die Möglichkeit, das Zelllysate mit dem GST-Fusionsprotein zu inkubieren und den entstandenen Proteinkomplex im Western Blot mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die gegen den Interaktionspartner gerichtet sind, zu untersuchen.

Für den Nachweis der Interaktion von TopBP1 und PARP-1 wurden folgende Teilfragmente von TopBP1 als GST-Fusionsproteine exprimiert: die sechste BRCT-Domäne, ein flankierendes Fragment als Kontrolle sowie der C-Terminus, welcher die sechste bis achte BRCT-Domäne umfasst (Abb.6A). Die cDNA der TopBP1-Teilfragmente lag *in frame* ligiert mit dem Gen für das GST-Protein bereits in Konstrukten vor.

Tab. 10: GST-Fusionskonstrukte von C-terminalen TopBP1-Fragmenten

Konstrukt	Vektor	Aminosäuren
pFH158	pGEX-4T-1	807-916 (TopBP1-BRCT6)
pSH29	pGEX-4T-3	774-1320 (TopBP1-BRCT6-8)
pFH160	pGEX-4T-1	935-1058 (TopBP1-ctr.)

Der *E. coli* Stamm BL21-Codon plus™-RIL wurde mit den Plasmiden transformiert. Dieser Stamm zeichnet sich durch den Besitz zusätzlicher Kopien von Arginin-, Isoleucin- und Leucin-tRNA Genen, verglichen mit anderen prokaryotischen Zellen, aus. Da die Sequenz des TopBP1-Proteins

vermehrt diese Aminosäuren aufweist, kann auf diese Weise sichergestellt werden, dass die Translation der rekombinanten RNA in ausreichender Menge möglich ist.

Durch Zugabe von IPTG konnte die Proteinsynthese von TopBP1 induziert werden. Die Größe der aufgereinigten GST-Fusionsproteine lag in folgenden Bereichen: 100 kDa für GST-TopBP1-BRCT6-8, 55 kDa für GST-TopBP1-BRCT6 und 50 kDa für GST-TopBP1-ctr. (Abb.6B).

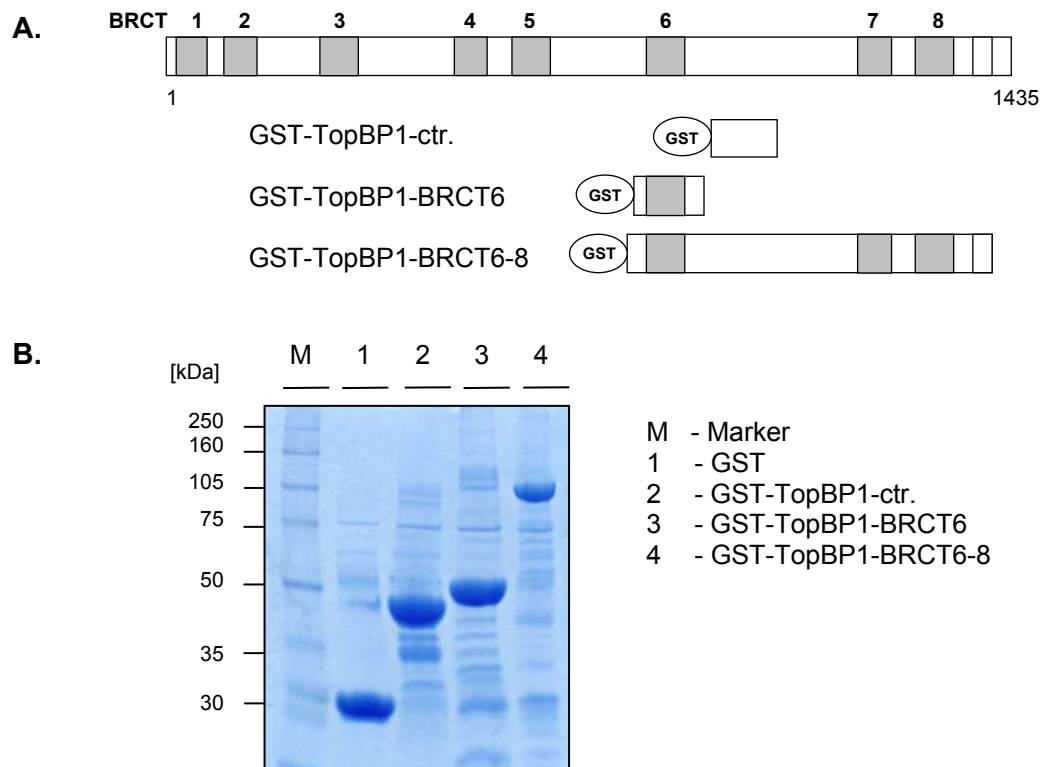


Abb.6: Aufgereinigte GST-TopBP1-Fusionsproteine aus *E. coli* BL21 Codon plus

- A.** Schematische Darstellung der als GST-Fusionsproteine hergestellten Fragmente von TopBP und deren Position. Die enthaltenen BRCT-Domänen sind grau unterlegt.
- B.** Analyse der GST-TopBP1-Fusionsproteine mit SDS-Gelelektrophorese. Aliquots der an Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen, über ein 10%iges Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Für den GST-*in vitro*-Interaktionsassay sollte PARP-1 mit [35 S]-Methionin radioaktiv markiert werden. Dazu wurde ausgehend von dem Konstrukt pBTM116-PARP-1 (freundlicherweise von C. Niedergang, ESBS, Illkirch, Frankreich zur Verfügung gestellt) zwei cDNA-Fragmente, welche für die Aminosäuren 1-524 (PARP_{DBD-AD}) und die Aminosäuren 1-372 (PARP_{DBD}) kodieren (siehe auch Abb.7), jeweils mittels PCR amplifiziert und als *Bam*HI/*Xho*I-Fragmente stromabwärts des T7-Promotors in den Vektor pBluescript KS+ kloniert. Damit wurde die Transkription durch die

T7-RNA-Polymerase ermöglicht. Transkription und Translation erfolgten mit einem gekoppelten System von Promega unter Verwendung eines Kaninchen-Retikulozytenlysats. Zur Kontrolle wurden 5 µl der *in vitro*-Translatate (IVT) von PARP-1 auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Größe der Produkte lag erwartungsgemäß bei 68 kDa für PARP_{DBD-AD} bzw. bei 46 kDa für PARP_{DBD} (Schema Abb.7A).

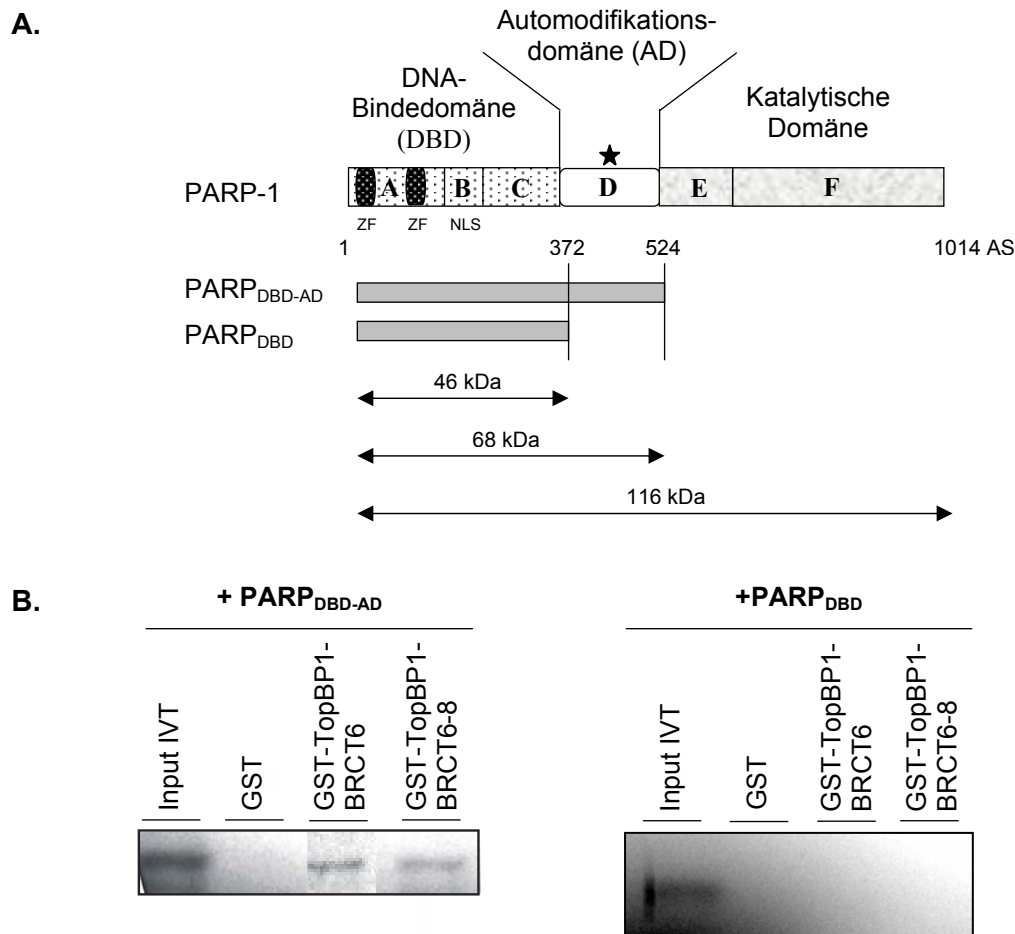


Abb.7: PARP-1 bindet im *in vitro*-Interaktionsassay an TopBP1

- A.** Schematische Darstellung von PARP-1 und dessen Domänen-Gliederung (nach de Murcia & Shall, 2000) sowie der *in vitro* translatierten Deletionsmutanten, die auf eine Interaktion mit TopBP1 getestet wurden. ★ Zeigt die die BRCT-Domäne an.
- B.** TopBP1-BRCT6 und TopBP1-BRCT6-8 wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Gleiche Mengen der gereinigten Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sephrose gekoppelt und mit *in vitro* translatierten PARP-1-Fragmenten inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und [³⁵S]-markierte PARP-1-Fragmente durch Autoradiographie detektiert. Als Größenstandard wurde die im Bindungstest eingesetzte Menge des IVT-PARP_{DBD-AD} bzw. IVT-PARP_{DBD} aufgetragen.

Im Folgenden wurden die GST-TopBP1 Fusionsproteine auf eine Interaktion mit den PARP-1-Fragmenten untersucht. Dazu wurden die beiden an Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteine,

GST-TopBP1-BRCT6 und GST-TopBP1-BRCT6-8, jeweils mit dem radioaktiv markierten PARP-1-Fragmenten inkubiert. In jedem Ansatz wurden 20 µg Fusionsprotein eingesetzt, entstandene Volumenunterschiede wurden durch Zugabe entsprechender Mengen der festen Matrix (ohne gebundenes Protein) ausgeglichen. Nach mehreren Waschschritten wurden die an die Glutathion-Matrix gebundenen Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die markierten Proteine über ein Autoradiogramm detektiert.

Abbildung 7B zeigt das Ergebnis: An beide GST-TopBP1-Fragmente band PARP_{DBD-AD}, welches sowohl aus DNA-Bindedomäne (DBD) als auch aus Automodifikationsdomäne (AD) besteht. Als Negativkontrolle wurde GST ohne Fusionsprotein verwendet. In diesem Ansatz fand keine Bindung statt. Auch zwischen der DNA-Bindedomäne von PARP-1 allein (PARP_{DBD}) und den GST-TopBP1-Fusionsproteinen war keine Wechselwirkung detektierbar. Daraus lässt sich schließen, dass für eine Interaktion der beiden Proteine die sechste BRCT-Domäne von TopBP1 und die Automodifikationsdomäne von PARP-1 vorhanden sein müssen.

Um diese *in vitro* Interaktion in einem weiteren Experiment zu bestätigen, wurden die cDNAs, die für PARP_{DBD-AD} und PARP_{DBD} kodieren in den Vektor pcDNA3 kloniert. HeLa-Zellen wurden anschließend mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode transient mit diesen Plasmiden transfiziert. Auf diese Weise wurden die Proteine unter der Kontrolle des starken CMV-Promoters exprimiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und wie im Abschnitt 2.3.17.7 beschrieben lysiert. Der Proteingehalt des Zelllysats wurde mittels Bradford-Test bestimmt. Für den Bindungstest wurden 300 µg Protein eingesetzt. Das an die immobilisierten TopBP1-Fragmente gebundene PARP-1 wurde im Western Blot mit Antikörpern nachgewiesen, die gegen den C-Terminus der DNA-Bindedomäne von PARP-1 gerichtet sind.

Aus Abb.8A ist ersichtlich, dass das GST-TopBP1-BRCT6 Fusionsprotein auch in diesem Experiment mit PARP_{DBD-AD} interagiert. Außerdem konnte auch gebundenes Wildtyp-PARP-1, welches von HeLa-Zellen konstitutiv exprimiert wird, nachgewiesen werden. Beide PARP-1 Proteine, sowohl das Gesamtprotein (PARP-1, endogen) als auch die um die katalytische Domäne verkürzte Form (PARP_{DBD-AD}), banden nicht an GST oder GST-TopBP1-ctr. bzw. unspezifisch an die Glutathion-Sepharosematrix. In diesen Fällen waren die beiden Proteine nur im Überstand detektierbar.

Ebenso unterband die zusätzliche Deletion der Automodifikationsdomäne (PARP_{DBD}) eine Bindung an die sechste BRCT-Domäne von TopBP1 nahezu vollständig (Abb.8B).

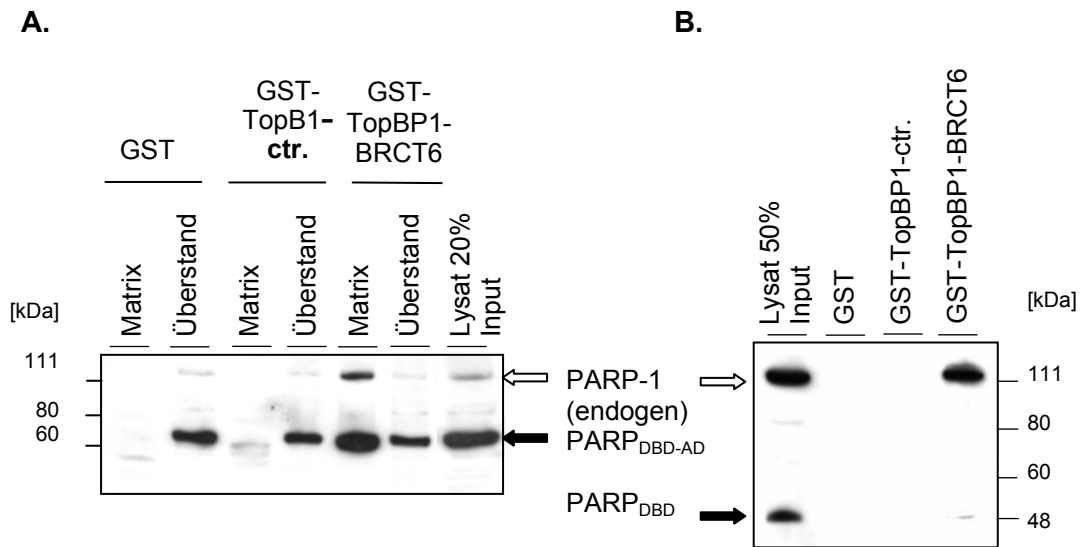


Abb.8: Interaktion von GST-TopBP1-Fusionsproteinen, immobilisiert an Glutathion-Sephrose, mit endogenem PARP-1 und ektopisch exprimierten PARP-Fragmenten aus HeLa-Zelllysaten

- A. TopBP1-BRCT6 und TopBP1-ctr. wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Gleiche Mengen der gereinigten Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sephrose gekoppelt und mit Lysat von mit pcDNA3-PARP_{DBD-AD} transfizierten HeLa-Zellen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine (Matrix) und ein Aliquot der nicht gebundenen Proteine (Überstand) über ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und enthaltenes PARP-1 mittels Western Blot nachgewiesen.
- B. Der *Pull-down-Assay* wurde wie oben beschrieben mit den gleichen Fusionsproteinen durchgeführt. Es wurde Zelllysate von HeLa-Zellen verwendet, welche zuvor mit pcDNA3-PARP_{DBD} transfiziert worden waren. An die Matrix gebundene Proteine wurden auf einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und gebundenes PARP-1 im Western Blot mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

3.1.3 *In vivo* Interaktion von TopBP1 und PARP-1

Um die *in vivo* Interaktion von endogenem TopBP1 und PARP-1 zu überprüfen, wurden die Proteine aus dem HeLa S3-Zelllysate mit spezifischen Antikörpern immunopräzipitiert. Um unspezifische Bindungen auszuschließen wurden als Negativkontrolle die gleichen Zellextrakte mit Präimmunserum aus Kaninchen, gebunden an Protein G-Sephrose, und der Sepharose-Matrix ohne Antikörper inkubiert. Die Produkte der Immunopräzipitation wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Abbildung 9 zeigt, dass PARP-1 mit TopBP1 koimmunopräzipitiert, nicht jedoch an Präimmunserum oder Protein G-Sephrose bindet. Im inversen Experiment konnte zwar PARP-1 mit dem monoklonalen Antikörper 4C10-5 effizient präzipitiert werden, allerdings war kein TopBP1 im Präzipitat detektierbar.

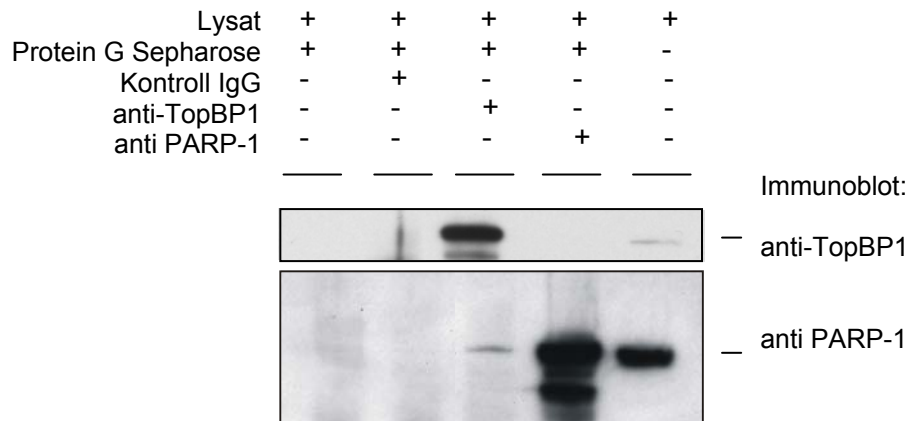


Abb.9: Koimmunopräzipitation von endogenem TopBP1 und PARP-1 aus HeLa S3-Extrakten

Zelllysate von HeLa S3-Zellen wurden mit anti-TopBP1 (Bahn 3), anti-PARP-1 als Positiv-Kontrolle (Bahn 4) sowie als Negativ-Kontrollen Präimmunserum (Bahn 2) und Protein G-Sepharose ohne Antikörper (Bahn 1) immunopräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen PARP-1 analysiert. In Bahn 5 sind 20% des Zelllysates, welches für die Immunopräzipitation verwendet wurde, aufgetragen.

3.1.4 Kolokalisation von TopBP1 und PARP-1 in den Kernen von HeLa-Zellen

Die intrazelluläre Lokalisierung von TopBP1 und PARP-1 wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen in fixierten HeLa-Zellen untersucht. TopBP1 wurde mit einem spezifischen Antiserum und Rhodamin-markierten sekundären Antikörper detektiert (rot). PARP-1 wurde mit Hilfe von monoklonalen (C-2-10) Primär- und FITC-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen (grün). Die Kerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI (blau) gegengefärbt. Abbildung 10 zeigt typische Verteilungsmuster in doppelt gefärbten proliferierenden HeLa-Zellen. Kolokalisierungen (gelb) sind in Sprenkeln über den Kern verteilt und in den Nukleoli sichtbar. Mit Rücksicht auf die Grenzen dieser Methode konnte eine räumliche Nähe beider Proteine gezeigt werden.

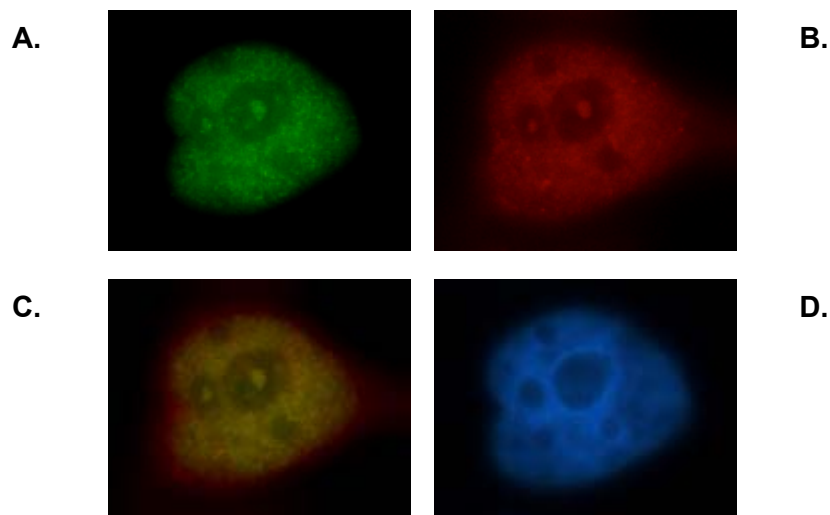


Abb.10: Kolokalisierung von TopBP1 und PARP-1 durch Immunfluoreszenzfärbung

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden in 3,8% Paraformaldehyd fixiert und mit polyklonalem Antiserum gegen TopBP1 bzw. monoklonalen Antikörpern gegen PARP-1 inkubiert. Durch Inkubation mit Rhodamin- bzw. FITC-markierten Sekundärantikörpern wurden die Proteine sichtbar gemacht.

A. Verteilung von PARP-1 (FITC) im Zellkern, B. Lokalisierung von TopBP1 (RRX), C. Überlagerung der beiden Aufnahmen zeigt Kolokalisierung (gelb) in Sprenkeln über den Kern verteilt und in den Nukleoli, D. DAPI

3.1.5 PARP-1 ADP-ribosyliert TopBP1-BRCT6

In dieser Arbeit sollte weiterhin geprüft werden, ob TopBP1 im Bereich der sechsten BRCT-Domäne durch PARP-1 *in vitro* ADP-ribosyliert wird. Dazu wurden die GST-Fusionsproteine GST-TopBP1-BRCT6 und TopBP1-BRCT6-8 mit rekombinantem PARP und NAD^+ in einer Poly(ADP-ribosyl)ierungsreaktion nach Ferro & Olivera (1982) inkubiert. 200 ng, 400 ng und 600 ng der GST-Fusionsproteine wurden jeweils mit 200 μM NAD^+ und 200 ng PARP inkubiert und die Reaktionsansätze im Anschluss im Western Blot analysiert. Um Poly(ADP-Ribose)-Ketten (PAR) an den Proteinen nachzuweisen, wurde die Membran zunächst mit anti-PAR inkubiert (Abb.11A). Immunoreaktive Proteine >116 kDa entsprechen automodifiziertem PARP-1. Diese Banden traten in allen Bahnen bzw. Reaktionsansätzen auf, die das Enzym und NAD^+ enthielten (Abb.11A oberer Ausschnitt Bahn a-c und e-j). PARP-1 ist Hauptakzeptor in solchen Reaktionen, was auf bis zu 28 Automodifikationsstellen innerhalb dieses Proteins zurückzuführen ist (Kawaichi *et al.*, 1981, Cherney *et al.*, 1987, Desmarais *et al.*, 1991). Es wurde gezeigt, dass die Reaktion zu Beginn mindestens 4 der 26 Glutamat-Reste innerhalb der Automodifikationsdomäne betrifft (Mendoza-Alvarez & Alvarez-Gonzalez, 1999).

Weitere Signale sind in den Bereichen 55 kDa (Abb.11A und B, Bahn e-g) und 105 kDa (Abb.11A, B und C, Bahn h-j) erkennbar. Um diese Banden genau zuordnen zu können, wurden die anti-PAR-Antikörper durch *Stripping* von der Membran entfernt und anschließend eine Inkubation mit anti-GST durchgeführt. Anhand des korrespondierenden anti-GST-Blots (Abb.11B) kann man schließen, dass diese Banden den ADP-ribosylierten TopBP1-BRCT6 (migriert bei 55 kDa) bzw. TopBP1-BRCT6-8 (läuft bei 105 kDa) GST-Fusionsproteinen entsprechen. Bemerkenswert ist jedoch, dass zunehmende Mengen der TopBP1-Fragmente nicht zu verstärkten Signalen im anti-PAR-Blot führen, sondern die Signalstärke abnimmt. Das kann auf einen möglichen Feedback- oder kompetitiven Mechanismus hindeuten.

In diesem Experiment wurde keine Modifikation von GST oder dem Kontroll-Fusionsprotein GST-TopBP1-ctr. detektiert (Abb.11A: Bahn 2 und 3 im Bereich von 25 kDa und 50 kDa). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der polyklonale anti-PAR-Antikörper im Western Blot spezifisch modifizierte Proteine erkennt. War PARP-1 im Reaktionsansatz nicht enthalten (siehe Abb.11A und C, Bahn d), erscheint kein Signal im Bereich 55 kDa.

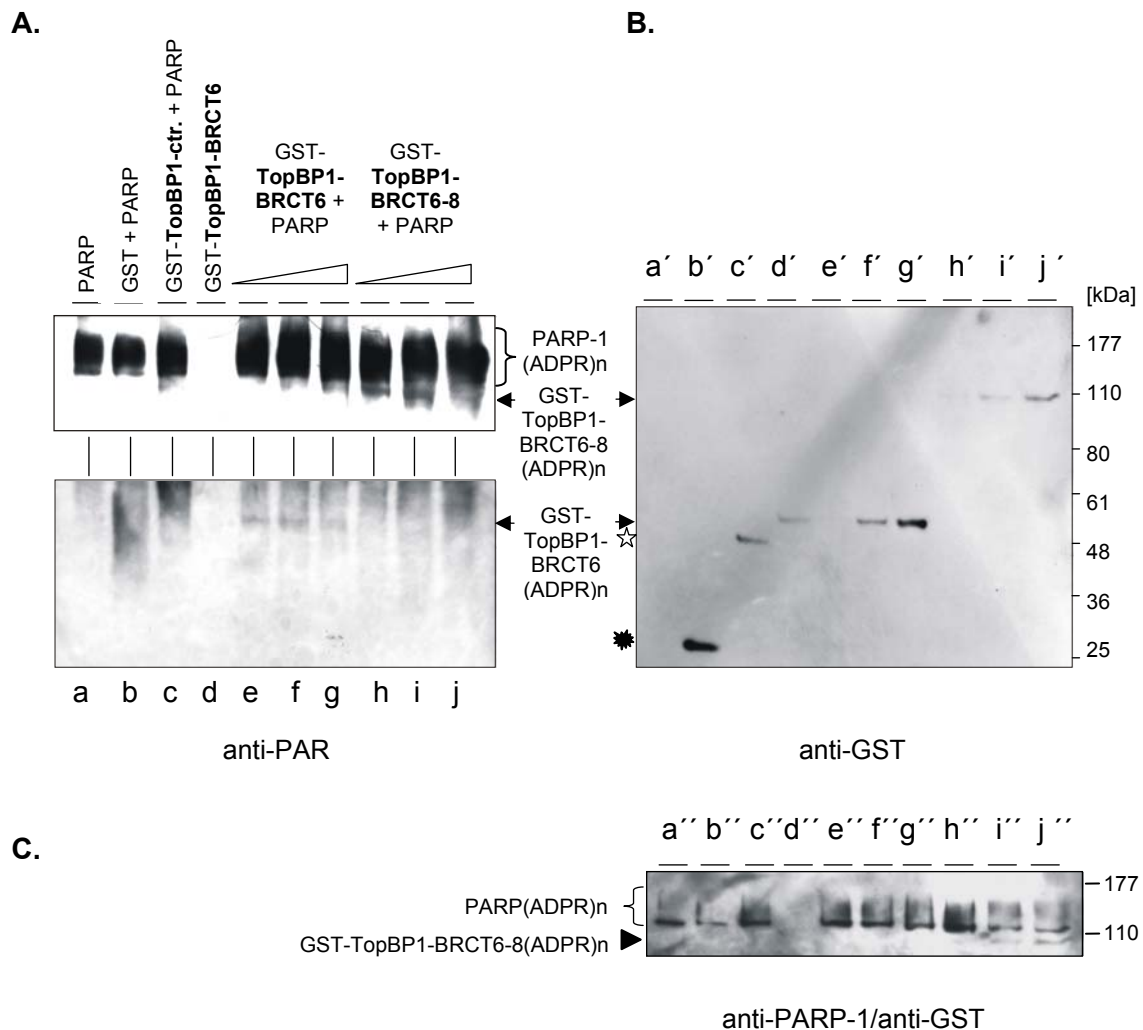


Abb.11: PARP katalysiert die Poly(ADP-ribosyl)ierung von TopBP1

Rekombinantes PARP (200 ng) wurde mit 200 μ M NAD⁺ für 30 min bei 25°C allein (Bahn a) oder in Gegenwart von 400 ng GST (Bahn b), 400 ng GST-TopBP1-ctr. (Bahn c), steigenden Mengen (200, 400, 600 ng) GST-TopBP1-BRCT6 (Bahn e-f) und zunehmenden Mengen (200, 400, 600 ng) GST-TopBP1-BRCT6-8 (Bahn h-j) inkubiert. Ein Reaktionsansatz (Bahn d) enthielt 400 ng GST-TopBP1-BRCT6, jedoch kein PARP. Die Reaktionsansätze wurden im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

- Immunoblot anti-PAR: Gezeigt sind Ausschnitte einer kurzen Filmexposition des oberen Membranbereichs sowie eine längere Filmexposition des unteren Membranbereichs. Automodifiziertes PARP migriert oberhalb 116 kDa (mit Klammern angedeutet). ◀ Lage der modifizierten TopBP1-Fragmente
- Die Membran wurde gestrippt und mit anti-GST inkubiert, ► modifizierte TopBP1-Fragmente, ☆ nicht modifiziertes TopBP1-ctr.-Fragment, ★ GST.
- Die Membran wurde nochmals gestrippt und mit anti-PARP-1 inkubiert. Dargestellt ist eine Überlagerung der resultierenden Filme der PARP-1- und GST-Immunoblots.

3.1.6 TopBP1 liegt in humanen Zellen Chromatin-assoziiert vor

Bei Immunfluoreszenzanalysen von humanen Zellen wurde TopBP1 preferentiell in Zellkernen lokalisiert (Abb.10, Yamane *et al.*, 2002, Herold *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2003, Greer *et al.*, 2003). Weiterhin wurden DNA-bindende Kapazitäten für die BRCT-Domänen 1 und 6-8 beschrieben (Yamane *et al.*, 1999). Das homologe Protein von TopBP1 aus *Xenopus* Xmus101/cut5 bindet Chromatin und ist Bestandteil der Initiationskomplexe für die Replikation und dabei essentiell für die Rekrutierung von Cdc45 an Replikationsstartpunkte (van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob TopBP1 auch in humanen Zellen mit Chromatin assoziiert ist und sich der Anteil chromatingebundenen des TopBP1 vom G1/S-Übergang zur G2/M-Phase verändert.

Dazu wurden HeLa S3-Zellen am G1/S-Übergang mittels doppeltem Thymidinblock synchronisiert und direkt nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock (0h) bzw. nach 1h, 3h, 6h, 9h, 12h geerntet. Ein Teil der Zellen wurde mit Propidiumiodid gefärbt, um mittels Durchflusszytometrie den DNA-Gehalt und damit den prozentualen Anteil der Zellen in den Phasen des Zellzyklus zu bestimmen. Die Mehrzahl der Zellen hatte 8 bis 9 Stunden nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock die G2-Phase erreicht (Abb.12A). Für den Chromatin-Bindetest wurde eine biochemische Fraktionierung der Zellen nach Mendez & Stillman (2000) durchgeführt (siehe 2.3.14.9). Die Zellen wurden mit Triton-X100 in einem Saccharose-reichen Puffer lysiert und die Zellkerne durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit gesammelt. Im Anschluß an zwei Waschschrte wurden die Kerne für 30 min in einem salzfreien Puffer aufgeschlossen. Eine zweite Zentrifugation trennte die löslichen Kernproteine von der unlöslichen Fraktion. Das finale Pellet repräsentierte nach einem weiteren Waschschrte Proteine, die an Chromatin bzw. die nukleare Matrix gebunden waren. Dieser Fraktionierungsmethode wurden sowohl asynchron wachsende Zellen als auch synchronisierte Zellen 1h, 3h, 6h und 9h nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock zugeführt. Im Western Blot wurde die lösliche Proteinfraction (S2) und die Chromatin-angereicherte Fraktionen (P3) auf das Vorhandensein von Orc2, Mek2 und TopBP1 untersucht (Abb.12B). Die nukleoplasmatischen Fraktionen (S3) sind aufgrund ihres geringen Proteingehaltes nicht gezeigt. Der Nachweis der Proteine Orc2 und Mek2 diente als Kontrolle für die Chromatinassoziation bzw. den Erfolg der Fraktionierung. Orc2 liegt während des gesamten Zellzyklus Chromatin-assoziiert vor und zeigt keine Fluktuation der Expression während des Zellzyklus (Mendez & Stillman, 2000, Stoeber *et al.*, 2001). Mek2 ist ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert und wird ebenfalls konstitutiv exprimiert (Zheng & Guan, 1994, Mendez & Stillman, 2000). Übereinstimmend mit diesen Angaben wurde Orc2 in dieser Arbeit nur in der Chromatin-angereicherten Fraktion (P3) in konstanter Menge zu allen getesteten Zeitpunkten detektiert werden. Mek2 wurde in den untersuchten Zellzyklusphasen in gleichen Konzentrationen hauptsächlich im Zytoplasma (S2)

nachgewiesen, Spuren dieses Proteins wurden jedoch auch in der Chromatin-angereicherten Fraktion gefunden. Das deutet darauf hin, dass die Zellfraktionierung mit dieser Methode nicht

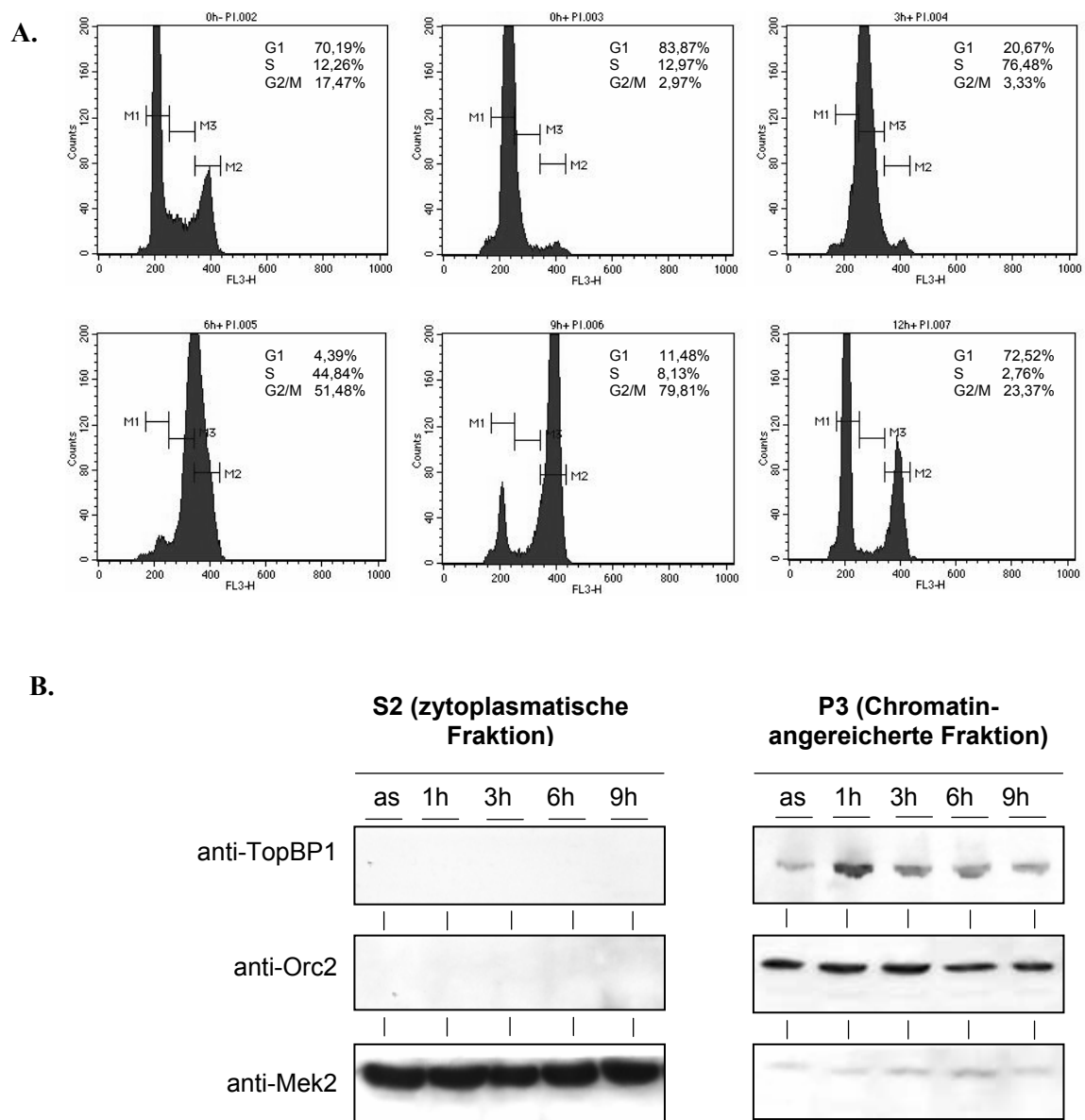


Abb.12: Proteinmengen und Chromatin-Assoziation von TopBP1 während des Zellzyklus

HeLa S3-Zellen wurden mittels doppeltem Thymidinblock am G1/S-Übergang synchronisiert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock geerntet.

- A.** Gezeigt ist der DNA-Gehalt asynchron wachsender Zellen (0h-) bzw. von Zellen 0h, 3h, 6h, 9h, 12h nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock. Die prozentualen Anteile der Zellen in den Phasen des Zellzyklus wurden mit Hilfe des Cell Quest Pro Computerprogramms kalkuliert.
- B.** Zellzyklus-regulierte Chromatin-Assoziation von TopBP1. Asynchron wachsende Zellen (as) sowie synchronisierte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock (1h, 3h, 6h, 9h) wurden biochemisch fraktioniert. Gleiche Proteinmengen der zytoplasmatischen (S2) und Chromatin-angereicherten Fraktion (P3) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und für Immunoblots mit den angezeigten Antikörpern auf PVDF-Membranen übertragen.

vollständig gelungen und es zur Verunreinigung der Kernfraktionen mit zytoplasmatischen Proteinen gekommen ist.

TopBP1 hingegen war nur in der Chromatin-angereicherten Fraktion vorhanden. Dort zeigte sich eine höhere TopBP1-Konzentration zu Beginn der S-Phase (1-3 Stunden nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock), die im weiteren Verlauf des Zellzyklus in Richtung G2/M-Übergang (Stunden 6-9) abnahm. Eine erhöhte TopBP1-Expression auf mRNA- und Gesamtproteinebene in der S-Phase wurde auch von Mäkinemi *et al.* (2001) und Yamane *et al.* (2002) nach Serumstimulation hungernder Zellen beschrieben.

3.1.7 *In vivo* Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45

Die Expression und Chromatinbindung von TopBP1 fluktuierte im Verlauf des Zellzyklus (siehe oben). Anhand isolierter HeLa-Kerne wurde gezeigt, dass die replikative DNA-Synthese durch ein gegen TopBP1 gerichtetes Antiserum vergleichbar effizient gehemmt werden kann, wie mittels neutralisierender Antikörper gegen die DNA Polymerasen α und ϵ (Mäkinemi *et al.*, 2001, Pospiech *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass TopBP1 im humanen System, ähnlich wie Rad4/Cut5 bzw. Dpb11 in Hefen oder Xmus101/cut5 in *Xenopus*, Funktionen bei der DNA-Replikation übernimmt. Das Auffinden weiterer Interaktionspartner von TopBP1, neben DNA Polymerase ϵ (Mäkinemi *et al.*, 2001), welche ebenfalls wichtig für die DNA-Replikation sind, könnte bei der Funktionsbestimmung helfen. Die TopBP1-homologen Proteine aus *S. cerevisiae* (Dpb11) und *Xenopus* (Xmus101/cut5) interagieren mit Cdc45 (Kamimura *et al.*, 1998, van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003). Dieses Protein ist essentiell für die Initiation der Replikation in Eukaryoten (Zou *et al.*, 1997, Mimura & Takisawa, 1998, Mimura *et al.*, 2000).

Um zu testen, ob eine Interaktion auch zwischen den humanen Proteinen stattfindet, wurde die Koimmunopräzipitation von endogenem TopBP1 und Cdc45 in Gesamtzelllysaten synchronisierter S-Phase HeLa S3-Zellen untersucht (Abb.13). Die präzipitierten Proteine wurden im Western Blot analysiert. Mit dem gegen TopBP1 gerichteten polyklonalen Antikörper konnte TopBP1 und auch Cdc45 gefällt werden. Im umgekehrten Experiment kopräzipitierten anti-Cdc45-Antikörper zusammen mit Cdc45 eine Fraktion des im Lysat enthaltenen TopBP1. Weder die Protein G-Sepharose noch das Präimmunserum präzipitierten eines der beiden Proteine.

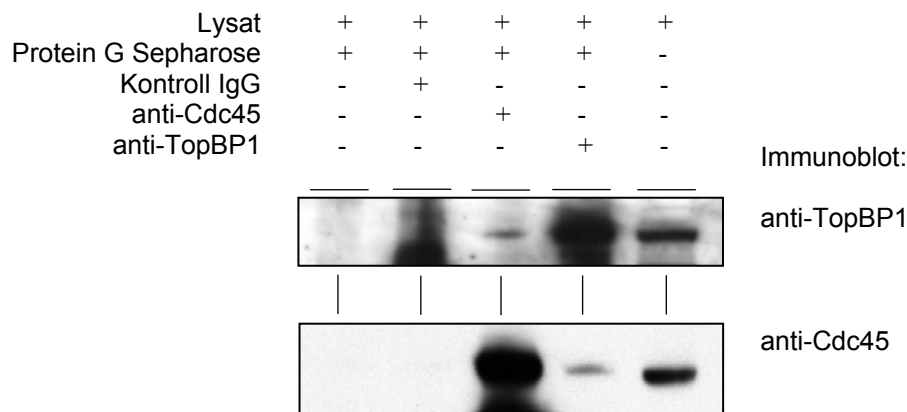


Abb.13: Endogenes TopBP1 und Cdc45 bilden einen Komplex

Dargestellt sind Ergebnisse von Koimmunopräzipitationen aus Lysaten von in der S-Phase synchronisierten HeLa S3-Zellen. Die Synchronisation erfolgte mittels doppeltem Thymidinblock. 3 Stunden nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock wurden Lysate hergestellt und Immunopräzipitationen mit Antikörpern gegen TopBP1 und Cdc45 durchgeführt. Als Kontrollen dienten Protein G-Sepharose mit bzw. ohne Präimmunserum. Die Immunkomplexe und Zellextrakte wurden im Western Blot analysiert.

3.1.8 *In vitro* Interaktionsassay zwischen TopBP1 und Cdc45

Die Koimmunopräzipitation von endogenem TopBP1 und Cdc45 aus Zelllysaten erlaubt keine Aussagen darüber, ob diese Proteine direkt miteinander interagieren oder als Bestandteil eines Multiproteinkomplexes gefällt wurden. Um diese Frage zu klären, sollte die *in vitro* Interaktion der rekombinanten Proteine überprüft werden. Von Weei-Chin Lin (Universität von Alabama, Birmingham, USA) wurde das Expressionsplasmid pGEX6P1-TopBP1 zur Verfügung gestellt. Es enthält die komplette cDNA von TopBP1 (Klon KIAA0259) über *EcoRI* *in frame* stromabwärts des Gens für die Glutathion *S*-Transferase (GST) kloniert (Liu *et al.*, 2003). GST-TopBP1 wurde in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Abbildung 14A zeigt Aliquots der Bakteriensuspension vor und nach Induktion der Expression mit IPTG. GST-TopBP1 migriert bei ca. 205 kDa.

Die cDNA des zu testenden Interaktionspartners Cdc45 wurde in pGADT7 über die Schnittstellen kloniert und durch *in vitro* Translation (IVT) radioaktiv markiert. An Glutathion-Sepharose gebundenes GST-TopBP1 oder GST wurde mit IVT-Cdc45 inkubiert. Die an die Glutathion-Matrix gebundenen Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die markierten Proteine über ein Autoradiogramm detektiert. Ein schwaches Signal, welches auf markiertes Cdc45 zurückzuführen ist, erscheint nur in Gegenwart von GST-TopBP1, nicht aber bei Verwendung von GST für den Bindetest (Abb.14C). Aufgrund der geringen Intensität des Signals und damit der geringen Menge gebundenen Cdc45 an GST-TopBP1, kann nicht eindeutig beurteilt werden, ob es

sich um eine spezifische und direkte Interaktion handelt. Einschränkungen ergeben sich auch aus der Qualität der Aufreinigung des GST-TopBP1-Fusionsproteins. Die Ausbeute war vergleichsweise gering (vgl. Abschnitt 3.1.2 Abb.6B) und ein ausgeprägtes Bandenmuster im Coomassie-Blau gefärbten Gel in Bereichen kleiner 205 kDa lassen Degradation, Translationsabbrüche oder Verunreinigungen mit bakteriellen Proteinen vermuten (Abb.14B).

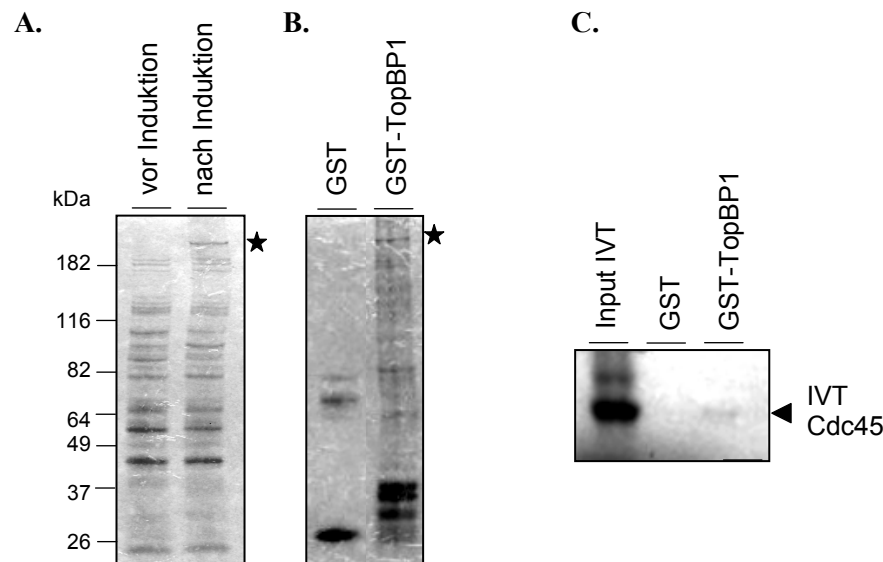


Abb.14: Expression des gesamten TopBP1 als GST-Fusionsprotein für einen *in vitro* Interaktionsassay mit Cdc45

- A.** Analyse der Expression von GST-TopBP1 vor und nach Induktion mit IPTG. Aliquoten der Bakteriensuspension wurden in Probenpuffer aufgenommen, über ein 8%iges Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. * GST-TopBP1.
- B.** Dargestellt sind die für den Interaktionsassay aus *E. coli* aufgereinigten und eluierten Proteine GST bzw. GST-TopBP1 in einem Coomassie-gefärbten Gel. Jeweils 10 µg dieser Proteine wurden für den Bindetest an Glutathion-Sepharose gebunden
- C.** GST und GST-TopBP1 wurde mit *in vitro* translatiertem, mit [³⁵S]-Methionin markierten Cdc45 inkubiert. Gebundenes CDC45 wurde über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen. Ein Aliquot des *in vitro* Translatats wurde zur Kontrolle mit auf das Gel geladen (Input IVT).

3.2 Untersuchungen zu den Effekten einer Suppression der TopBP1-Expression mittels RNA-Interferenz in humanen Zellen

Die gezielte Ausschaltung von Genen mit Hilfe der RNA-Interferenz ist eine mittlerweile anerkannte und häufig angewandte Technologie, um Genfunktionen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zu diesem Zweck ein Vektorsystem genutzt werden, dass eine stabile Expression von siRNAs in humanen Zellen erlaubt. Auf diese Weise sollten TopBP1-*knock down* Zellen mit dem Ziel hergestellt werden, anhand von Genexpressionsanalysen und Zell-Assays das Protein TopBP1 funktionell näher zu charakterisieren.

3.2.1 Konstruktion von pSUPER-TopBP1

Das pSUPER Vectorsystem, welches die Synthese von kurzen interferierenden RNAs in Säugerzellen ermöglicht, wurde von Thijn R. Brummelkamp (Brummelkamp *et al.*, 2002) etabliert und freundlicherweise von Rene Bernards (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) zur Verfügung gestellt. Der Vektor pBluescript II KS+ (Startagene) wurde dafür durch die Insertion des PolymeraseIII H1-RNA-Promotors mit *Bgl*II-Restriktionstelle modifiziert (Abb.15A). Dieser Promotor zeichnet sich dadurch aus, dass er kurze RNA-Transkripte produziert, die keinen poly-A-Schwanz besitzen. Außerdem besitzt er einen definierten Transkriptionsstart und ein Terminationssignal, bestehend aus fünf aufeinander folgenden Thymidinen (Bear *et al.*, 1990). Die Spaltung des Transkripts an der Terminationsstelle erfolgt nach dem zweiten Uridin, was zu zwei 3' überhängenden T oder U Nukleotiden führt, wie sie auch bei synthetischen siRNAs vorkommen. Das TopBP1-spezifische Insert für den Vektor wurde durch Aneinanderlagerung von zwei Oligonukleotiden (jeweils 64 nt) generiert, die sich wie folgt zusammensetzten: eine 19 Nukleotid-Sequenz aus dem 5'-Bereich der TopBP1-cDNA wurde durch 9 Spacernukleotide von der gleichen, jedoch revers komplementären 19 Nukleotidsequenz getrennt, war flankiert von einem Transkriptionstart- und Terminationsort und enthielt für die Klonierung einen *Bgl*II- (5'-Oligo) bzw. *Hind*III-Ort (3'-Oligo). Das daraus entstehende RNA-Transkript faltet sich spontan zu einer doppelsträngigen siRNA, sogenannten Haarnadelschleifen, die von DICER Enzymen gespalten werden können (Abb.15B.). Das komplette Konstrukt wurde von Michael Wanzel (IMT, Marburg) zur Verfügung gestellt.

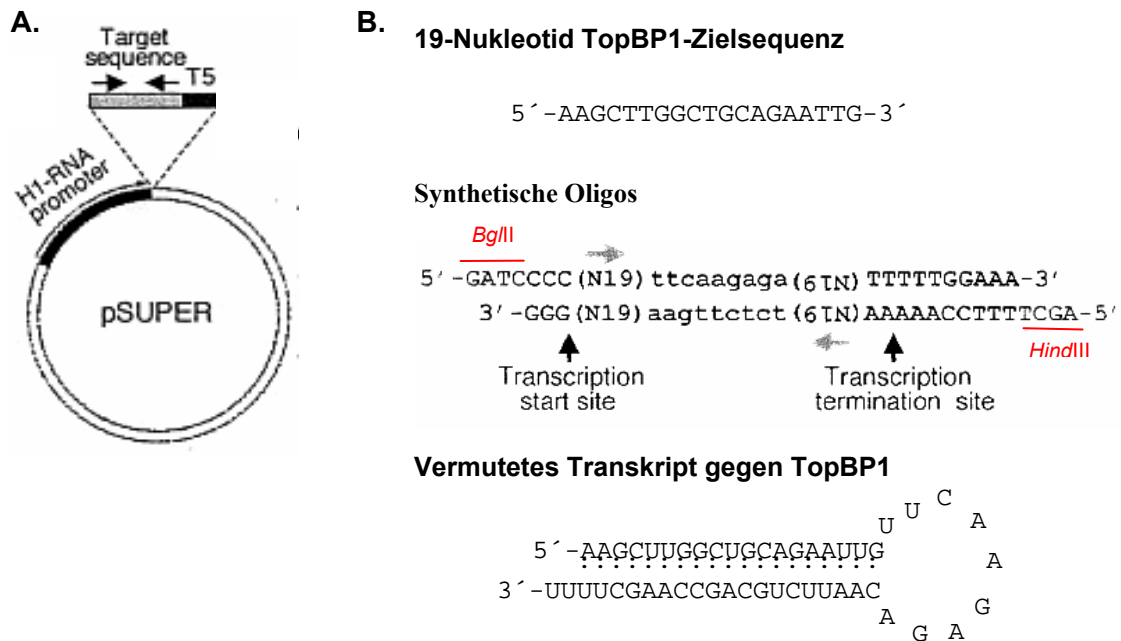


Abb.15: Darstellung der Vektor-basierten Gensuppression in Säugerzellen nach Brummelkamp *et al.*, 2002.

- Schema des pSUPER Vektors, ein Derivat des pBluescript II KS+ (Stratagene), in den der Polymerase III H1-RNA Promotor vor die Insertionsstelle der Zielsequenz kloniert wurde.
- Gezeigt ist die 19 Nukleotide lange TopBP1-Zielsequenz (cDNA). Das Gen-spezifische Insert, das mit dem Vektor ligiert wird enthält diese Sequenz, gefolgt von einem kurzen *Spacer* und einer zur Zielsequenz revers komplementären Sequenz (Gesamtlänge je 64 nt), weiterhin einen Transkriptionsstart und ein Terminationssignal sowie für die Insertion eine *Bgl*II- und *Hind*III-Stelle. Das resultierende RNA-Transkript bildet vermutlich eine Haarnadelstruktur aus, wobei deren Stamm aus den 19 bp der komplementären Zielsequenzen und die Schleife aus dem *Spacer* besteht.

3.2.2 Stabile Expression der TopBP1-siRNA in humanen Zellen

Um die Expression von TopBP1 mittels RNAi abzuregulieren, wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie Ls174T wie unter 2.3.11.2 beschrieben mit pSUPER oder pSUPER-TopBP1 zusammen mit pBABE-Puro transfiziert. Diese Zelllinie ist diploid und besitzt Wildtyp-Allele von p53 (van de Wetering *et al.*, 2002). Die Transfektanten wurden selektioniert, expandiert und nach 8-10 Tage geerntet. Im Western Blot wurde analysiert, wie effizient die Neusynthese von TopBP1 supprimiert war. Vorhandenes TopBP1 wird mit dieser Methode nicht aus den Zellen entfernt. Jeweils gleiche Gesamtproteinmengen wurden aufgetragen. TopBP1 wurde mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde Cdk2 nachgewiesen. Der aus den Immunoblots resultierende Film wurde eingescannt und densitometrisch ausgewertet. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis von drei unabhängigen Transfektionsversuchen. In den Zellen, die mit

pSUPER-TopBP1 transfiziert worden sind, war der TopBP1-Proteinlevel um 80-90% reduziert, verglichen mit der TopBP1-Menge in den Kontroll-Zellen (transfiziert mit pSUPER). Die Expression von Cdk2 wurde von den siRNAs nicht beeinflusst. In einer weiteren Kontrolle wurden Zellen mit pSUPER-Miz1, einem Vektor für die Abregulation von Miz1 (Wanzel *et al.*, 2005), transfiziert. Dabei wurden keine messbaren Effekte auf die TopBP1-Expression erzeugt (nicht gezeigt). Die TopBP1-Depletion in pSUPER-TopBP1-Transfektanten ist demnach spezifisch.

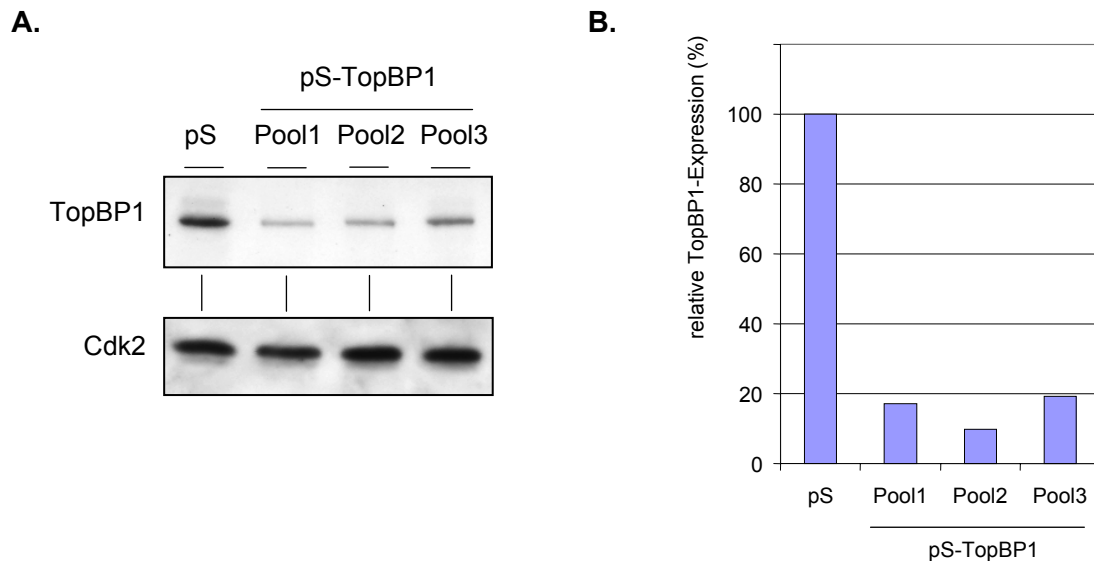


Abb.16: Durch Transfektion humaner Zellen mit pSUPER-TopBP1 wird die TopBP1-Expression effektiv supprimiert.

- A. Ls174T-Zellen wurden mit pSUPER (Kontrolle) oder pSUPER-TopBP1 zusammen mit pBABE-Puro transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gesplittet, in Puromycin-haltigem Medium selektioniert und expandiert. Für die Western Blot-Analysen wurden die Zellen nach weiteren 7-9 Tagen geerntet und lysiert. Gezeigt ist die TopBP1-Expression (obere Reihe) von drei unabhängigen Zellpools, die mit pSUPER-TopBP1 transfiziert worden sind im Vergleich zu Kontrollzellen (mit pSUPER transfiziert). Der Cdk2-Nachweis (untere Reihe) diente als Ladekontrolle.
- B. Die densitometrische Auswertung des Films ergab eine 80-90%ige Reduktion der TopBP1-Expression bei den pSUPER-TopBP1-Transfektanten im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.3 Analyse der Genexpression nach Abregulation von TopBP1

Um zu untersuchen, welchen Einfluss TopBP1 auf die Genexpression in Ls174T-Zellen und auf die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigungen hat, wurden Mikroarray-Experimente durchgeführt. Es wurden die Expressionsprofile von TopBP1 *knock down*-Zellen mit denen von Kontrollzellen, die TopBP1 in normalen Mengen exprimierten, jeweils vor und nach Exposition mit Adriamycin, verglichen. Dazu wurde total-RNA aus Zellen extrahiert, die (wie oben beschrieben) mit pSUPER-TopBP1 oder pSUPER und einem Resistenzvektor transfiziert und selektioniert worden waren. Ein

Teil der Transfektanten wurde vor der RNA-Extraktion für 15 Stunden mit Adriamycin versetzt, um DNA-Schäden zu induzieren. Die RNA wurde in Fluoreszenz-markierte cDNA umgeschrieben, die unterschiedlich markierten cDNA-Proben der TopBP1 *knock down*-Zellen und der Kontrollzellen wurden vereint und für 16 Stunden an cDNA-Arrays kohybridisiert. Auf dem Array sind 11540 cDNA-Sonden immobilisiert, die einen Querschnitt humaner Gene bzw. cDNAs repräsentieren. Nach mehreren stringenten Waschschritten wurde die cDNA-Arrays eingescannt und statistisch ausgewertet.

In den Tabellen 11-14 sind die in unabhängigen Experimenten reproduzierbaren Ergebnisse zusammengefasst. In Abwesenheit von DNA-Schäden war die Expression von insgesamt 28 (58) Genen in TopBP1 *knock down*-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen um mindestens den Faktor 2,0 (den Faktor 1,5 in Klammern) verändert. Die Mehrzahl der veränderten Gene war abreguliert (Tab.11: 25 (46)). Nur 3 (12) Gene wiesen in diesem Experiment eine erhöhte Expression auf (Tab.12).

Nach DNA-Schädigung durch Adriamycin zeigten 3 (13) Gene eine veränderte Expression in TopBP1 *knock down*-Zellen verglichen mit Kontrollzellen. Davon waren 2 (5) Gene aufreguliert (Tab.14) und 1 (8) abreguliert (Tab.13).

Tab. 11: Liste von Genen, die relativ zu Kontrollzellen in TopBP1 *knock down*-Zellen abreguliert sind

Allgemeine Genbezeichnung	Gensymbol	Genbank Zugangsnummer	Veränderung
H1 histone family, member 0	H1F0	H57830	5,1
endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	ENG	AA446108	4,2
H1 histone family, member 0	H1F0	W69399	4,1
chromosome 8 open reading frame 4	C8orf4	H16793	4,0
Homo sapiens clone IMAGE:110582 mRNA sequence		T90074	3,6
Homo sapiens clone alpha1 mRNA sequence		AA065090	2,7
RAB6A, member RAS oncogene family	RAB6A	H20138	2,6
Human BRCA2 region, mRNA sequence CG006.	BRCA2	AA127017	2,5
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	NIP3	AA446839	2,4
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	NIP3	AA063521	2,3
egl nine homolog 3 (C. elegans)	EGLN3	R00226	2,3
Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion	CADPS	R42894	2,3
adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	AP2B1	N52267	2,2
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa	POLR2A	AA010216	2,2
Cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	CDK9	N80054	2,2
Homo sapiens, clone MGC:9515 IMAGE:3903371, mRNA, complete cds		N68408	2,1
RAB6A, member RAS oncogene family	RAB6A	H20138	2,1
ESTs, Moderately similar to fatty acid amide hydrolase [H.sapiens]		T70327	2,1
v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	KIT	N20798	2,1
protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	PPP1R10	AA071526	2,1
histone 2, H2be	HIST2H2BE	AA010223	2,0
interferon consensus sequence binding protein 1	ICSBP1	N62269	2,0

Homo sapiens cDNA FLJ13458 fis, clone PLACE1003361.		N48252	2,0
Spindlin	SPIN	AA428181	2,0
aldolase C, fructose-bisphosphate	ALDOC	R39463	2,0
integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	ITGA2	AA463257	2,0
Solute carrier family 38, member2	SLC38A2	R27457	2,0
Homo sapiens clone IMAGE:111995, mRNA sequence		R23924	2,0
ESTs, Highly similar to S17361 transcription elongation factor IIS (clone pHIS 1) - human [H.sapiens]	TCEA1	H28344	2,0
son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	SOS1	H64325	1,9
HP1-BP74	HP1-BP74	T90920	1,9
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	MAP3K2	AA447971	1,9
decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	DAF	R09561	1,9
ESTs, Moderately similar to hypothetical protein FLJ20234 [Homo sapiens]		T70344	1,9
transmembrane trafficking protein	TMP21	W94609	1,9
pyruvate dehydrogenase phosphatase	PDP	H11036	1,8
vav 3 oncogene	VAV3	H10045	1,8
general transcription factor IIH, polypeptide 3, 34kDa	GTF2H3	AA460838	1,8
glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	EPRS	AA010158	1,8
glia derived nexin precursor (GDN) (Protease nexin 1)	SERPINE2	R95691	1,8
Homo sapiens, clone IMAGE:6058556, mRNA	PAK2	H22412	1,8
Homo sapiens cDNA: FLJ22050 fis, clone HEP09454.		T49854	1,8
Homo sapiens cDNA FLJ33311 fis, clone BNGH42005235.		N23399	1,8
epidermal growth factor receptor kinase substrate EPS8	EPS8	AA446651	1,7
splicing factor 1	SF1	N46360	1,7
tumor differentially expressed 1	TDE1	H23255	1,7
EST		H48226	1,7
cyclin D2	CCND2	H84154	1,7
hypothetical protein FLJ36874	FLJ36874	T83665	1,7
signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	SSR3	AA453487	1,7

Tab. 12: Liste von Genen, die relativ zur Kontrolle in TopBP1 knock down-Zellen aufreguliert sind

Allgemeine Genbezeichnung	Gensymbol	Genbank Zugangsnummer	Veränderung
Homo sapiens, clone IMAGE:4794726, mRNA		AA127965	3,0
heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	HSPE1	AA448396	2,3
heat shock 105kDa/110kDa protein 1	HSPH1	AA485151	2,0
aquaporin 3	AQP3	R92737	1,9
hypothetical protein DKFZp761L0424.1		AA457485	1,8
cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1 precursor	COX6A1	AA482243	1,8
insulin induced gene 1	INSIG1	H59620	1,8
metallothionein 1L	MT1L	N80129	1,8
CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2	AA010065	1,7
CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2	AA397813	1,7
metallothionein		N55459	1,7
metallothionein 1G	MT1G	H53340	1,7
metallothionein 1B (functional)	MT1B	H72723	1,7

Tab. 13: Liste von Genen, die relativ zur Kontrolle in TopBP1 *knock down*-Zellen nach DNA-Schädigung abreguliert sind

Allgemeine Genbezeichnung	Gensymbol	Genbank Zugangsnummer	Veränderung
aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	AKR1C1	R93124	2,1
bone morphogenetic protein 4	BMP4	AA463225	1,8
Nucleolin	NCL	AA476294	1,8
GLE1 RNA export mediator-like (yeast)	GLE1L	R41973	1,7
Cytochrom P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	AA448157	1,7
Tubulin beta1	TUBB1	AA427899	1,6
Citrate synthase, mitochondrial precursor	CS	AA416759	1,6
nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	H92201	1,6

Tab. 14: Liste von Genen, die relativ zur Kontrolle in TopBP1 *knock down*-Zellen nach DNA-Schädigung aufreguliert sind

Allgemeine Genbezeichnung	Gensymbol	Genbank Zugangsnummer	Veränderung
tumor rejection antigen (gp96) 1	TRA1	AA598758	2,6
Zinc finger protein 174	ZNF174	AA700196	2,0
natural killer cell transcript 4	NK4	AA458965	1,9
hypothetical protein FLJ11565	FLJ11565	AA099523	1,6
hypothetical protein DKFZp761L0424.1		AA457485	1,6

Zur Validierung der Mikroarray-Daten wurden Gene ausgewählt und ihre Expressionsstärke mittels semi-quantitativer RT-PCR überprüft. Die RT-PCR wurde mit RNA-Proben durchgeführt, die auch für die Mikroarray-Analysen genutzt worden sind. Die Erststrang-cDNAs wurden unter Verwendung der PowerScript Reversen Transcriptase (Clontech) und Oligo-dT(15)-Primern synthetisiert (siehe 2.3.9.2). Um den linearen Bereich der PCR-Amplifikation zu bestimmen, wurden nach verschiedenen Zyklen Aliquote entnommen und im Agarosegel kontrolliert. Als *housekeeping*-Gene dienten *S14* (ribosomales Protein S14) und *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase). Übereinstimmend mit den Mikroarray-Daten ergab die RT-PCR eine signifikant verminderte Expression der Gene *HIF0*, *RAB6A*, *ALDOC*, *POLR2A* und *KIT1* in TopBP1 *knock down*-Zellen relativ zu Kontrollzellen. Für *HSPE1* konnte eine verstärkte Expression in TopBP1 *knock down*-Zellen bestätigt werden (Abb.17A).

Ebenso konnte die Abregulation der Gene *CS* und *NCL* in TopBP1-depletierten Zellen nach Adriamycin-Behandlung verglichen mit Kontrollzellen mit dieser Methode bestätigt werden.

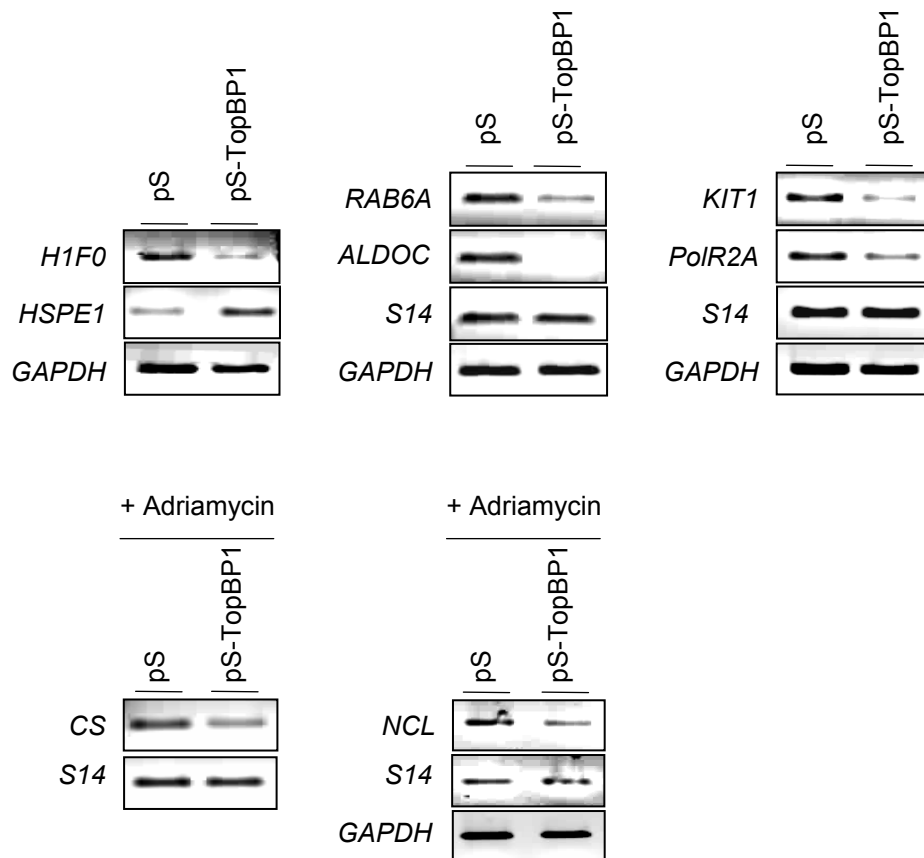


Abb.17: Semiquantitative RT-PCR zur Validierung der Mikroarray-Daten

Ls174T-Zellen wurden mit pSUPER oder pSUPER-TopBP1 zusammen mit pBABE-Puro transfiziert und anschließend selektioniert. Ein Teil der Transfektanten wurde 15 Stunden vor RNA-Extraktion mit Adriamycin versetzt. 2,5 µg Total-RNA wurde mit PowerScript Reverser Transkriptase und Oligo-dT(15)-Primern in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifikation ausgewählter Gene wurden PCRs mit spezifischen Primern durchgeführt. *S14* bzw. *GAPDH* dienten als interne Kontrollen für jede Reaktion.

3.2.4 Einfluss des TopBP1-knock downs auf das Wachstum etablierter Zelllinien

Um den Effekt einer verminderten TopBP1-Expression auf phänotypischer Ebene zu untersuchen, wurden Zellwachstumsversuche mit Ls174T- oder HeLa-Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von DNA-Schäden durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.9.3). Dazu wurden die Zellen mit pSUPER-TopBP1 bzw. pSUPER und pBABE-Puro kotransfiziert und selektioniert. Die Puromycin-resistenten Zellen wurden in geringer Dichte ausgesät. Um DNA-Schädigungen zu induzieren wurde jeweils ein Teil der Ls174T-Zellen für eine Stunde mit Adriamycin (1 µg/ml) behandelt. Ein Teil der HeLa-Transfektanten wurde mit UV-B (500 J/m²) bestrahlt. Die überlebenden Kolonien wurden 14 Tage später angefärbt. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Versuche. Sowohl Ls174T-Kontrollzellen (pSUPER) als auch Ls174-T-Transfektanten (pSUPER-TopBP1), in denen

TopBP1 depletiert war, bildeten in Abwesenheit von DNA-Schäden multiple Kolonien. Unterschiede waren nach DNA-Schädigung zu erkennen (Abb.18A). Während die Kontrollzellen in der Lage waren zu proliferieren, war die Koloniebildung in TopBP1 *knock down*-Zellen stark beeinträchtigt.

Die analogen Experimente mit HeLa-Zellen ergaben ein vergleichbares Bild (Abb.18B). Eine supprimierte TopBP1-Expression hatte in ungestressten Zellen keinen Einfluss auf das Koloniewachstum, inhibierte jedoch die Proliferation gestresster Zellen.

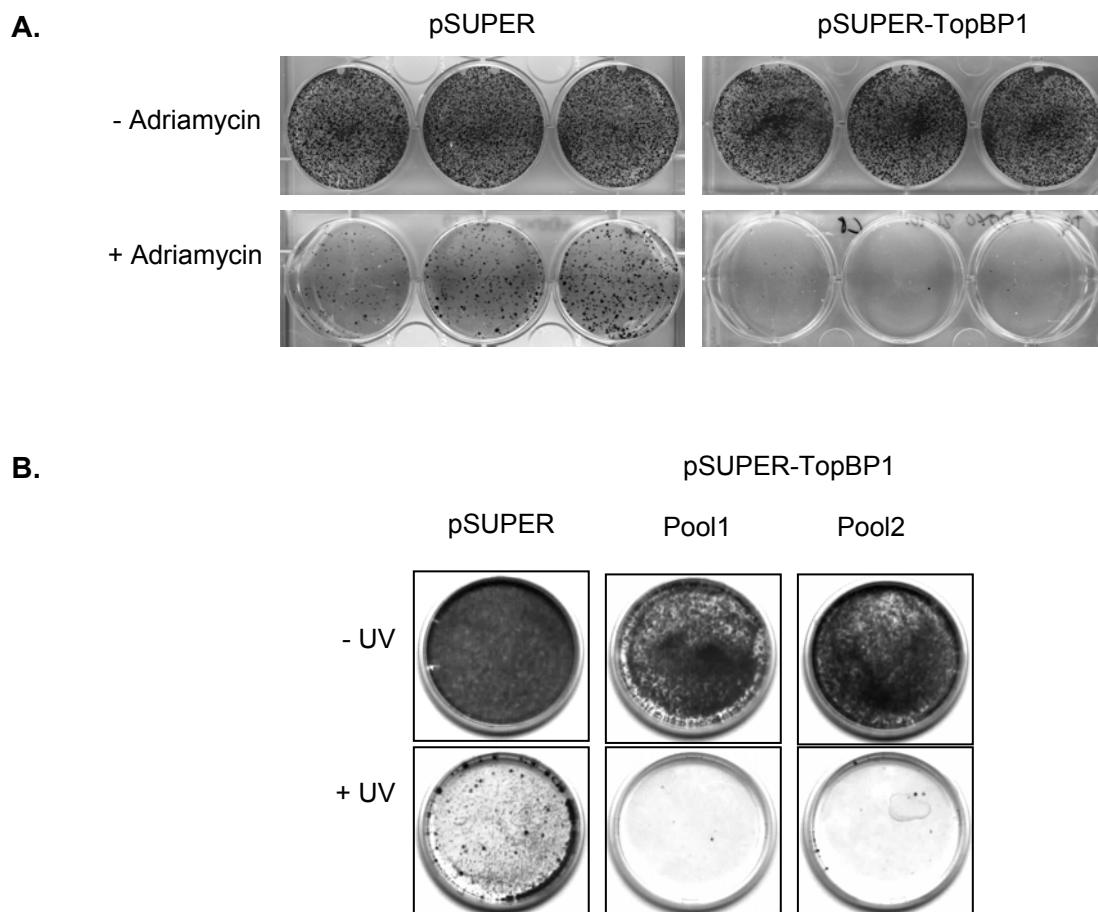


Abb.18: Effekte der RNAi-vermittelten Suppression der TopBP1-Expression auf das Wachstum ungestresster und gestresster etablierter Zelllinien im Langzeitversuch

Ls174T- und HeLa-Zellen wurden mit pSUPER oder pSUPER-TopBP1 und pBABE-Puro kotransfiziert und selektioniert. Puromycin-resistente Zellen wurden in niedriger Dichte ausplattiert. Ein Teil der Ls174T- und HeLa-Zellen wurde mit Adriamycin behandelt bzw. UV-B bestrahlt. Die ausgewachsenen Kolonien wurden nach 14 Tagen fixiert und angefärbt. Die Proliferation TopBP1-depletierter Zellen wird erst nach DNA-Schädigung nennenswert inhibiert verglichen mit Kontrollzellen.

- A. Koloniewachstum von Ls174T-Transfektanten mit und ohne Adriamycinbehandlung (Triplikate).
- B. Koloniewachstum von HeLa-Transfektanten mit und ohne UV-B-Bestrahlung. Gezeigt sind pSUPER-Kontrollzellen und Zellpools, die aus zwei unabhängigen Transfektionen mit pSUPER-TopBP1 hervorgingen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden funktionelle Untersuchungen des Proteins TopBP1 unter der Fragestellung vorgenommen, ob sich neue Hinweise einer Beteiligung von TopBP1 an so wichtigen zellulären Prozessen wie DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation ergeben. Insbesondere die Identifizierung neuer Wechselwirkungen mit bekannten Proteinen der Reparaturmaschinerie bzw. mit replikativen Proteinen ermöglicht interessante Rückschlüsse auf die Rolle von TopBP1 und dessen Regulation. Nach dem gezielten Ausschalten der TopBP1-Expression mit Hilfe von RNA-Interferenz wurde untersucht, welche Konsequenzen der Verlust dieses Proteins auf transkriptioneller Ebene, in Gegenwart oder Abwesenheit von DNA-Schäden, hat und ob das Wachstum der Zellen beeinflusst wird.

4.1 Identifizierung von PARP-1 als neuen Interaktionspartner von TopBP1 – regulatorische Konsequenzen für das Myc-Miz1-Netzwerk?

Die Struktur von TopBP1, die insgesamt acht BRCT-Domänen umfasst, deutet auf multiple Möglichkeiten für Interaktionen mit anderen Proteinen hin (Bork *et al.*, 1997, Manke *et al.*, 2003, Rodriguez *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2003). Die bekannten, in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner von TopBP1 sind in Tab.1 (Abschnitt 1.2) zusammengefasst. Eines der mit TopBP1 wechselwirkenden Proteine ist der Transkriptionsfaktor *Myc-interacting zinc finger protein 1* (Miz1) (Herold *et al.*, 2002). Miz1 vermittelt die transkriptionelle Repression durch Myc (Überblick in Wanzel *et al.*, 2003). Verschiedene Studien haben demonstriert, dass Miz1 z.B. die Promotoren der Gene *P21CIP1* und *P15INK4B* binden und aktivieren kann und dass diese Transaktivierung durch Miz1 über die Assoziation mit Myc negativ reguliert wird (Seoane *et al.*, 2001, 2002, Staller *et al.*, 2001, Herold *et al.*, 2002, van de Wetering *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2003, Brenner *et al.*, 2004). Miz1 ist im speziellen an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden beteiligt. Anhand von Koimmunopräzipitationen und Gelshiftanalysen wurde gezeigt, dass Miz1 in ungestressten Zellen in einem Komplex mit TopBP1 vorliegt. Die Transaktivierung durch Miz1 ist bei einer Bindung von TopBP1 inhibiert. Nach UV-Bestrahlung humaner Keratinozyten wird Miz1 aus diesem Komplex freigesetzt und kann so, im aktiven Zustand, die Aufregulation der *P21CIP1*-Expression bewirken (Herold *et al.*, 2002, Wanzel *et al.*, 2003).

Welcher Mechanismus der Dissoziation des TopBP1-Miz1-Komplexes nach DNA-Schädigung zugrunde liegt, ist noch ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass eine posttranslationale Poly(ADP-Ribosyl)ierung von TopBP1 durch PARP-1 die Freisetzung von Miz1 bewirken könnte.

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Arbeitshypothese, dass TopBP1 ein Substrat der Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1) sein könnte. Aus Sequenzvergleichen der sechsten BRCT-Domäne von TopBP1 und der Automodifikationsdomäne von PARP-1 ging eine hohe Ähnlichkeit hervor (Yamane *et al.*, 1997). Die genaue Analyse der Aminosäuresequenz ergab zudem eine Übereinstimmung der Aminosäuren 811-832 innerhalb der sechsten BRCT-Domäne von TopBP1 mit einem Poly(ADP-Ribose) (PAR)-bindenden Sequenzmotiv, wie es von Pleschke *et al.* (2000) und Schmitz *et al.* (1998) anhand von Polymer-Blotanalysen beschrieben worden ist. Solche Motive kommen in Proteinen vor, die funktionell mit DNA-Reparatur (z.B. p53, XRCC1, DNA Ligase III, Ku70, XPA), Transkription (NF- κ B), Signaltransduktion (MARCKS) oder der Aufrechterhaltung der Chromatinintegrität (z.B. Histone, Telomerase, Cenpa, Cenpb, Bub3) in Verbindung stehen (Malanga *et al.*, 1998, Schmitz *et al.*, 1998, Pleschke *et al.*, 2000, Saxena *et al.*, 2002). In den meisten Fällen überlappen die PAR-Bindesequenzen mit funktionell wichtigen Domänen, die für Protein-Protein-Wechselwirkungen, DNA-Bindung, Lokalisierung in oder aus dem Kern und Proteindegradation verantwortlich sind (Pleschke *et al.*, 2000). Das Auftreten solcher Motive erlaubt allerdings nur eine Vorhersage nichtkovalenter Bindungen von PAR. Es lässt keine Schlussfolgerungen im Hinblick auf eine direkte Interaktion mit PARP-1 oder kovalente Modifikationen von Proteinen zu. Dennoch wurde für p53, XRCC1, Cenpa, Cenpb, Bub3 und Ku70/80 gezeigt, dass diese Proteine mit dem Enzym interagieren und durch PARP-1 modifiziert werden (Wesierska-Gadek *et al.*, 1996, Masson *et al.*, 1998, Saxena *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2004), wobei PAR kovalent an die Akzeptorproteine gebunden wird. Ob das auch im Fall von TopBP1 zutrifft, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eine wichtige posttranslationale Proteinmodifikation, die spezifisch nach DNA-Schädigungen auftritt (Althaus & Richter, 1987, Cleaver & Morgan, 1991, Satoh *et al.*, 1994, Szabo, 2000). Die zugrunde liegende Reaktion wurde erstmals Anfang der sechziger Jahre beschrieben. Chambon *et al.* (1963) beobachteten damals, dass Nikotinamid-Mononukleotid in Zellkernpräparationen den Einbau von markiertem ATP in die säureunlösliche Fraktion induziert. Das verantwortliche Enzym PARP-1 konnte kurz darauf aus Rattenleber isoliert werden (Sugimura *et al.*, 1967). Zwanzig Jahre später gelang die Klonierung der humanen PARP-1 cDNA simultan durch mehrere Gruppen (Ushiro *et al.*, 1986, Suzuki *et al.* 1987, Alkhatib *et al.*, 1987). Das Enzym hydrolysiert NAD^+ zu ADP-Ribose und Nikotinamid und überträgt die ADP-Ribose auf Akzeptorproteine oder im Rahmen einer Automodifikationsreaktion auf sich selbst (Smith, 2001, Alvarez-Gonzalez *et al.*, 1999). Dabei wird eine Bindung zwischen der 1''-Hydroxylgruppe der ADP-Ribose und einer Aminosäureseitenkette des Akzeptorproteins (Glutamat, Aspartat, Lysin) geknüpft. Die Addition der nächsten ADP-Ribose-Einheit erfolgt über 1''-2'-glykosidische Ribose-Ribose-Bindungen. Die Polymere können eine Länge von über 200

Einheiten haben und über 1''-2''-glykosidische Ribose-Ribose-Bindungen verzweigt sein. Aufgrund der Aktivität der Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) haben die Polymere in der Zelle nur eine kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten. PARG hydrolysiert PAR zu ADP-Ribose (Brochu *et al.*, 1994, Affar *et al.*, 1999).

Neben PARP-1 sind zurzeit 17 weitere putative PARP-Homologe bekannt (Überblick in Ame *et al.*, 2004). Davon sind nur wenige bisher genauer charakterisiert: PARP-2 (Ame *et al.*, 1999, Schreiber *et al.*, 2002), PARP-3 (Augustin *et al.*, 2003), vault-PARP (PARP-4, Kickhoefer *et al.*, 1999), Tankyrase 1 (Smith *et al.*, 1998) und Tankyrase 2 (Lyons *et al.*, 2001). Nach wie vor ist PARP-1 das am intensivsten untersuchte Mitglied der PARP-Familie. Den wesentlichen strukturellen Domänen des ca. 116 kDa großen Proteins konnten spezifische Funktionen zugeordnet werden: (i) die aminoterminal DNA-Bindedomäne (DBD) enthält zwei Zinkfinger-Motive, die die Bindung an DNA-Strangbrüche vermitteln (Ikejima *et al.*, 1990), und eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization signal*, NLS), (ii) die Automodifikationsdomäne beinhaltet ein BRCT-Motiv und fungiert als Interaktionsfläche für verschiedene nukleäre Partner, (iii) die carboxyterminale katalytische Domäne ist für die NAD⁺-Bindung und die Übertragung der ADP-Ribose auf Akzeptorproteine verantwortlich (Marsischky *et al.*, 1995).

PARP-1 modifiziert in erster Linie sich selbst, aber auch eine Vielzahl anderer Kernproteine (Mendoza-Alvarez & Alvarez-Gonzalez, 1999, D'Amours *et al.*, 1999). Das Anfügen der stark negativ geladenen ADP-Ribose-Polymere vermindert vermutlich die Affinität der Proteine für DNA und führt zu deren Ablösen sowie zur Inaktivierung des Enzyms (Ferro & Olivera, 1982, Hunter, 1998). Andererseits ist auch vorstellbar, dass verschiedene PAR bindende Proteine über nicht-kovalente Wechselwirkungen zu einem Komplex rekrutiert werden und Signalprozesse auslösen (El-Khamisy *et al.*, 2003, Okano *et al.*, 2003, Hong *et al.*, 2004, Althaus, 2005). Möglicherweise kommt aber eher eine Kombination beider Varianten der Komplexität und Dynamik der Vorgänge am nächsten. Der transiente Charakter dieser Modifikation und das Auftreten nach DNA-Schädigung legen nahe, dass es sich um einen Regulationsprozess in frühen Stadien der DNA-Schadensantwort handelt (Shall, 2002, Cleaver & Morgan, 1991). Neben der Beteiligung an DNA-Reparaturmechanismen wie *base excision repair* (BER), *single strand break repair* (SSBR) (Leppard *et al.*, 2003) und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, spielt PARP-1 in zahlreichen weiteren zellulären Prozessen eine Rolle (Übersicht in de Murcia & Shall, 2000). Dazu gehört die Regulation der Transkription z.B. über die ADP-Ribosylierung von oder die direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (Oei *et al.*, 1998, Simbulan-Rosenthal, 2003, O'Hassa *et al.*, 2003, Andreone *et al.*, 2003). Außerdem ist PARP-1 an der Modulation der Chromatinstruktur beteiligt, indem es u.a. Histone modifiziert (Poirier *et al.*, 1982, Morin *et al.*, 1999, D'Amours *et al.*, 1999) und wie aktuell gezeigt wurde, die DNA-Methylierung beeinflusst (Reale *et al.*, 2005) oder als strukturelle Komponente von Nucleosomen bzw. als Bestandteil eines

Korepressor-Komplexes eine kompakte, transkriptionell reprimierte Chromatinstruktur unterstützt (Kim *et al.*, 2004). Ein Beitrag von PARP-1 wird auch für die Regulation der DNA-Replikation diskutiert. Die Einflussnahme auf diesen Prozess würde durch die Interaktion mit DNA Polymerase α (Dantzer *et al.*, 1998) und als Komponente des Multiprotein-DNA-Replikationskomplexes möglich (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1996).

Eine weitere wichtige Rolle übernimmt das Enzym bei Apoptose. Einerseits wird PARP-1 im Verlauf der Caspase-abhängigen Apoptose proteolytisch gespalten und inaktiviert (Boulares *et al.*, 1999). Andererseits kann es durch Freisetzung des mitochondrialen proapoptotischen Proteins AIF an einem Caspase-unabhängigen Apoptose-Mechanismus beteiligt sein (Yu *et al.*, 2002, Hong *et al.*, 2004) oder auch durch Überaktivierung und vermutlich exzessive PAR-Synthese zur Depletion des zellulären NAD^+ -Vorrats und damit zum Zusammenbruch der Glykolyse bzw. der Atmungskette führen (Gaal *et al.*, 1987).

Aufgrund der strukturellen Eigenschaften von TopBP1 wurde eine mögliche Wechselwirkung mit PARP-1 *in vitro* und *in vivo* überprüft. Die *in vitro*-Versuche umfassten verschiedene GST-pull down Experimente. Dabei wurden affinitätsaufgereinigte GST-Fusionsproteine von TopBP1-Deletionsmutanten mit rekombinanten PARP-1-Fragmenten oder mit Zelllysaten inkubiert, die sowohl endogenes PARP-1 als auch ektopisch exprimierte PARP-1-Fragmente enthielten. Diese Versuche zeigten, dass TopBP1 *in vitro* über die sechste BRCT-Domäne an die Automodifikationsdomäne von PARP-1 bindet. Die Interaktion wurde durch die Koimmunopräzipitation von endogenem PARP-1 mit TopBP1-Antikörpern *in vivo* bestätigt. Die Immunfluoreszenzanalysen legen ebenfalls eine dynamische Wechselwirkung zwischen TopBP1 und PARP-1 nahe. Beide endogenen Proteine waren in ungestressten HeLa-Zellen diffus und in granulären Foci über den gesamten Zellkern verteilt, die teilweise Überlappungen aufwiesen und damit an diesen Stellen eine räumliche Nähe andeuteten. Eine vergleichbare Lokalisierung von PARP-1 wurde in der Literatur anhand von endogenem oder überexprimiertem Protein gezeigt (Dantzer *et al.*, 1998, Alvarez-Gonzalez *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2002, Kanai *et al.*, 2003, Yung *et al.*, 2004).

Zusammengefasst ergeben die Ergebnisse dieser Interaktionsstudien, dass die Bindung von TopBP1 an PARP-1 keine ADP-Ribosylierung benötigt, die beiden Proteine also direkt aneinander binden und nicht über PAR-Ketten. Die Literatur beinhaltet experimentelle Daten, die ebenfalls zeigen, dass Proteine mit nicht modifizierten Mitgliedern der PARP-Familie interagieren. Masson *et al.* (1998) identifizierten die Assoziation zwischen der Automodifikationsdomäne von PARP-1 und dem BER-Protein XRCC1. Anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen in lebenden Zellen und BRET-Assays demonstrierten Yung *et al.* (2004) Kolokalisierungen und Wechselwirkungen von PARP-1 und Topoisomerase I. Auch der Transkriptionsfaktor E2F-1 bindet PARP-1 über deren

Automodifikationsdomäne unabhängig von der enzymatischen Aktivität (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2003). Bae *et al.* (2003) berichteten von einer Interaktion der Tankyrase 1, ebenfalls ein Mitglied der PARP-Familie, mit dem proapoptotischen Protein Mcl-1.

Unterstrichen wird eine mögliche räumliche und funktionelle Wechselwirkung zwischen TopBP1 und PARP-1 durch den *in vitro*-Nachweis der Oligo(ADP-Ribosyl)ierung von TopBP1 durch das Enzym in Gegenwart von NAD⁺ und aktivierter (mit Strangbrüchen versehener) DNA. Auch für die Modifikation ist die sechste BRCT-Domäne von TopBP1 ausreichend, wie die Detektion mittels PAR-spezifischen Antikörpern im Western Blot erwies (Abschnitt 3.1.5 Abb.11). Die als Kontrollen eingesetzten Proteine GST und GST-TopBP-ctr. zeigten keine Modifikation. Bemerkenswert war die Abnahme der Signalintensität, die mit dem Einsatz eines dreifachen Überschusses der TopBP1-GST-Fusionsproteine GST-BRCT6 und GST-BRCT6-8 gegenüber dem Enzym einherging. Für TopBP1 ist ebenfalls die Bindung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen beschrieben. Das betrifft insbesondere die BRCT-Domänen 1-2 sowie 6-8 (Yamane & Tsuruo, 1999). Es ist vorstellbar, dass die Bindung der TopBP1-GST-Fusionsproteine an die DNA-Strangbrüche mit der PARP-1-Bindung konkurriert und damit auch die PARP-1-Aktivierung beeinflusst. Eine verminderte PARP-Automodifikation wurde in dem Zusammenhang jedoch nicht beobachtet.

Für eine Beteiligung von TopBP1 an der Schadensantwort der Zelle gibt es mittlerweile vielfältige Hinweise (siehe auch Abschnitt 1.2). Dazu zählen z.B. Interaktionen mit Proteinen, die ebenfalls mit diesem Prozess in Verbindung stehen, wie PML, hRad9, Polymerase ϵ und E2F-1 (Xu *et al.*, 2003, Greer *et al.*, 2003, Mäkinen *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2003). TopBP1 wird von der so genannten *checkpoint* Kinase ATM phosphoryliert (Yamane *et al.*, 2002). Weiterhin wurde nach der Behandlung von Zellen mit DNA schädigenden Agenzien oder mit UV- bzw. γ -Bestrahlung die Lokalisierung von TopBP1 in Foci beschrieben, die für blockierte Replikationsgabeln stehen (Mäkinen *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2003, Jurvansuu *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TopBP1 mit PARP-1 interagiert. Dessen umfassende Bedeutung unter anderem für die DNA-Schadensantwort ist seit langem bekannt und wird auch aktuell weiter intensiv untersucht. Die genauen biologischen Effekte der Interaktion und der Modifikation von TopBP1 konnten noch nicht geklärt werden. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse im Kontext des in Abschnitt 1.2 erläuterten *dual input*-Modells (Herold *et al.*, 2002, Wanzel *et al.*, 2003), könnte PARP-1 über TopBP1 eine neue regulatorische Rolle im Myc-Miz1-Netzwerk einnehmen.

Das Modell besagt, dass p53 und Miz1 kooperativ an den *P21CIP1* Promotor binden und in Folge von UV-Bestrahlung die Expression von *P21CIP1* induzieren. Das Protein p21 ist in der Lage die Aktivität von Cdks zu inhibieren, welche für den Eintritt in die S-Phase essentiell sind (Sherr &

Roberts, 1999). Die Aktivität von Miz1 wird durch die Bindung von Myc und TopBP1 reguliert. Eine Bindung bedeutet die Repression der Transaktivierung durch Miz1.

Anhand der Daten dieser Arbeit kann das Modell für den Bereich der zellulären Antwort auf UV-Bestrahlung um weitere Aspekte ergänzt und folgendermaßen formuliert werden: Unter normalen physiologischen Bedingungen liegen Fraktionen der Proteine TopBP1, PARP-1 und Miz1 in einem Komplex vor. Dabei erfolgt die Bindung zwischen TopBP1 und PARP-1 über die sechste BRCT-Domäne bzw. die Automodifikationsdomäne. Die Interaktionsfläche für die Bindung von Miz1 an TopBP1 ist die siebente BRCT-Domäne (Herold *et al.*, 2002). Sowohl Miz1 als auch PARP-1 sind unter diesen Bedingungen inaktiv. Nach DNA-Schädigung bindet PARP-1 DNA-Strangbrüche und wird aktiviert. Damit wird die Auto(ADP-ribosyl)ierung von PARP-1 und simultan die oligo(ADP-ribosyl)ierung von TopBP1 an der sechsten BRCT-Domäne induziert. Dieser Vorgang kann zum einen zur Dissoziation des TopBP1-PARP-1-Komplexes führen, zum anderen kann das Anfügen der PAR-Ketten im Bereich der sechsten BRCT-Domäne von TopBP1 auch die Assoziation mit Miz1 an der benachbarten siebenten BRCT-Domäne sterisch behindern. Mit diesem Mechanismus könnte die Freisetzung von Miz1 aus dem Komplex mit TopBP1 nach DNA-Schädigung begründet werden. Über die Expression von p21^{Cip1} und die resultierende Inhibition von Cdks könnte es zu einem vorübergehenden Zellzyklusarrest kommen, welcher der Zelle Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden verschaffen würde.

Im Fall irreparabler Schäden wäre es denkbar, dass Aktivitäten von PARP-1 oder p53 Apoptoseprozesse einleiten (Überblick in Shiloh, 2003). Andererseits unterliegt Miz1 auch der Kontrolle durch das Proto-Onkogen Myc (Staller *et al.*, 2001, Herold *et al.*, 2002). In Gegenwart einer deregulierten Myc-Expression besteht daher die Gefahr einer malignen Transformation, indem Myc z.B. die Transkription von *P21CIP* reprimiert (Gartel *et al.*, 2001, Sheen & Dickson, 2000, Wu *et al.*, 2003). Kürzlich wurde mit 14-3-3 η ein weiteres Protein identifiziert, das ebenfalls in die Regulation von Miz1 eingreift. Die Bindung von 14-3-3 η an Miz1 verhindert dessen DNA-Assoziation. Dadurch wird die Repression von Miz1-Zielgenen, ein weiterer Mechanismus mit dem Miz1 zum Proliferationsstopp von Zellen nach DNA-Schädigung beiträgt, inhibiert (Wanzel *et al.*, 2005). Um den Einfluss von PARP-1 auf Funktionen von TopBP1 und damit auf Myc-Miz1-Regulationsnetzwerk zu bestätigen, sind noch weitere Experimente nötig.

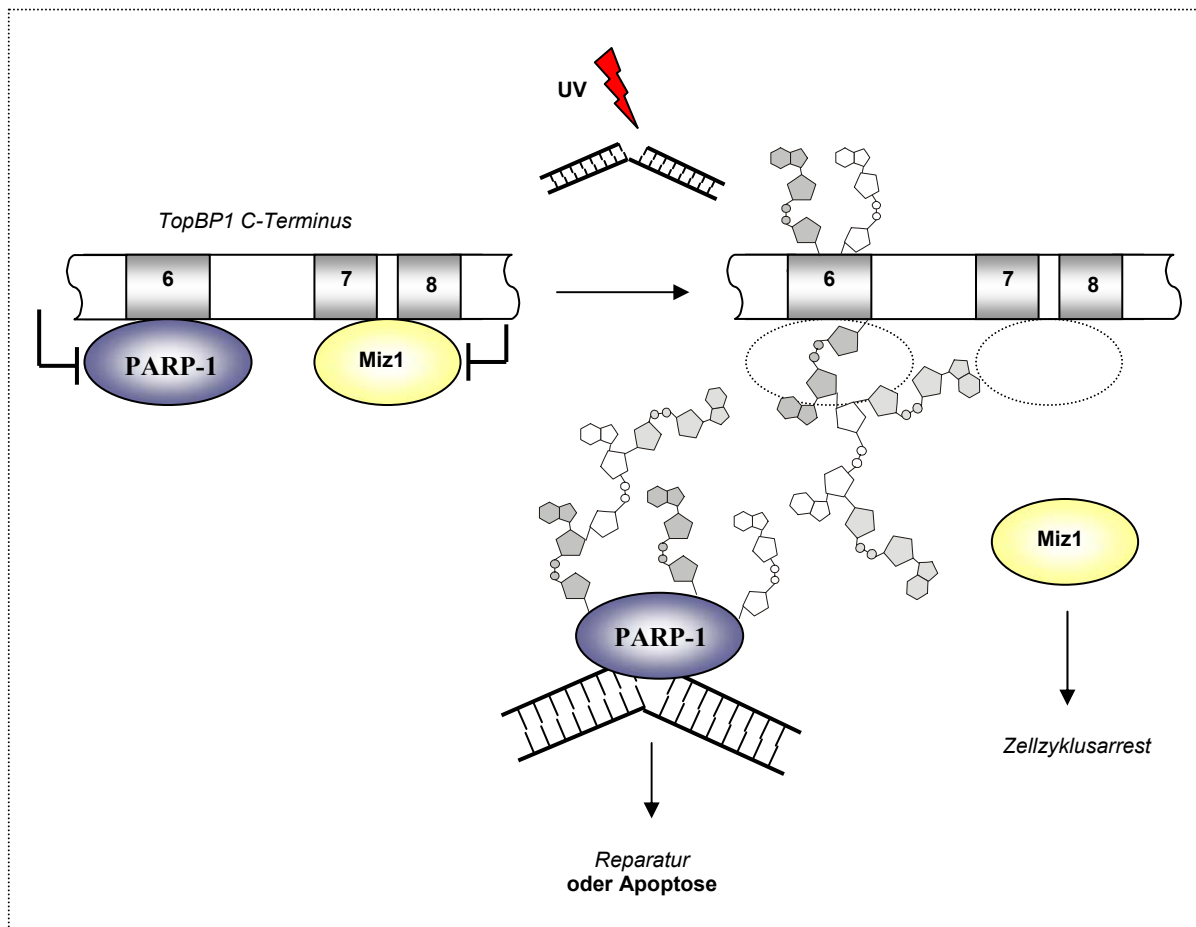


Abb.19: Modell für einen hypothetischen Mechanismus für die Dissoziation des Komplexes aus

TopBP1-Miz1-PARP-1 nach DNA-Schädigung. In normalen Zellen sind PARP-1 und Miz1 an TopBP1 gebunden und ihre Funktionen inhibiert. Durch Schädigung der DNA entstehen Strangbrüche. PARP-1 bindet daran und wird aktiviert. Dadurch kommt es zur Auto(ADP-Ribosyl)ierung von PARP-1 und zur Modifikation von TopBP1 mit PAR. Die veränderten Ladungsverhältnisse an TopBP1 bewirken die Freisetzung gebundener Proteine wie Miz1 und PARP-1. Miz1 bewirkt als Transkriptionsfaktor einen Zellzyklusarrest. PARP-1 rekrutiert die Reparaturmaschinerie oder induziert im Fall exzessiver Schäden Apoptose.

4.2 TopBP1 ist Chromatin-assoziiert und bindet an Cdc45 – Hinweise auf eine Rolle in der Replikation?

TopBP1 hat strukturelle Ähnlichkeiten zu Dpb11 aus *Saccharomyces cerevisiae* und Rad4/Cut5 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Yamane *et al.*, 1997, Mäkinen *et al.*, 2001). Daraus könnten sich auch gemeinsame funktionelle Eigenschaften ableiten lassen. Der Besitz von acht BRCT-Domänen verglichen mit vier BRCT-Domänen der Hefepoteine, weist außerdem auf zusätzliche Funktionen von TopBP1 hin.

Offensichtlich haben die Vielzeller-Homologe der Hefeproteine zusätzliche BRCT-Domänen akquiriert. Das zeigt sich auch bei dem TopBP1-Homologen aus dem Nematoden *C. elegans*, welches sechs dieser Domänen enthält (Mäkinen *et al.*, 2001). In *Drosophila* wurde ein weiteres zu TopBP1 homologes Protein identifiziert, das diese Tendenz durch den Besitz von sieben BRCT-Domänen unterstützt: Mus101 (Yamamoto *et al.*, 2000). Aus *Xenopus* konnte mit Xmus101/cut5 ebenfalls ein Protein isoliert werden, das acht BRCT-Domänen enthält (Van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003). Die Hefeproteine wurden mit DNA-Replikation, Zellzykluskontrolle und die Antwort auf DNA-Schäden in Verbindung gebracht (Wang & Elledge, 1999, 2002, Araki *et al.*, 1995, Saka *et al.*, 1994). Der Fortlauf der S-Phase des Zellzyklus ist in Rad4/Cut5-Mutanten blockiert oder stark verzögert (Saka *et al.*, 1994). In derselben Zellzyklusphase assoziieren Dpb11 und Polymerase ϵ simultan mit Replikationsursprüngen (Masumoto *et al.*, 2000). Vergleichbare Funktionen übernimmt Mus101 in *Drosophila*, da Mutanten eine erhöhte Sensibilität gegenüber Mutagenen und Defekte bei der DNA-Synthese sowie Chromosomeninstabilitäten aufwiesen (Yamamoto *et al.*, 2000). Schließlich wurde für *Xenopus* Xmus101/cut5 gezeigt, dass es eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation in *Xenopus* Eiextrakten übernimmt und dabei für die Rekrutierung der DNA Polymerasen α und ϵ sowie von Cdc45 an Chromatin benötigt wird (Van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003). Auch in menschliche Zellen existieren schon erste Beweise für eine Beteiligung von TopBP1 am DNA-Replikationsprozess. (i) Die TopBP1-Expression nimmt zu Beginn der S-Phase zu. (ii) Ein TopBP1-Antiserum war in der Lage, die DNA-Replikation in isolierten HeLa-Kernen zu inhibieren. (iii) TopBP1 kolokalisiert mit blockierten Replikationsgabeln, wenn die DNA-Synthese inhibiert wird, allerdings nicht mit Stellen aktiver DNA-Synthese. (iv) TopBP1 interagiert mit Polymerase ϵ , was mit Hilfe von Koimmunopräzipitationen gezeigt wurde (Mäkinen *et al.*, 2001). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Mechanismen, die die Initiation der DNA-Replikation kontrollieren, in Hefen bis zu Säugerzellen konserviert sind.

Ausgehend von dieser Hypothese wurden in dieser Arbeit Experimente durchgeführt, die weiteren Aufschluss über die Funktion von TopBP1 bei der chromosomalen DNA-Synthese erbringen sollten. Untersuchungen mit Hefen und *Xenopus* zeigten, dass die Initiation der DNA-Replikation ein vielstufiger Prozess ist (Überblick in Bell & Dutta, 2002), der durch das regulierte Zusammenfügen eines prä-replikativen Komplexes (pre-RC) an jedem Replikationsursprung kontrolliert wird (Diffley, 1996, Nasheuer *et al.*, 2002). Das aktuelle Verständnis dieser Vorgänge und deren Koordination kann folgendermaßen zusammengefasst werden: Der Aufbau der *pre-RC* beginnt mit der Bindung des aus sechs Untereinheiten bestehenden *origin recognition complex* (ORC) an spezifische Replikationsursprungsstellen im Genom (Überblick in Stillman, 2005). ORC dient als Interaktionsplattform für die schrittweise Anlagerung weiterer Initiationsfaktoren. In der

frühen G1-Phase bindet Cdc6 an ORC und ist verantwortlich für die Rekrutierung der *minichromosome maintenance* Proteine (MCM, Mcm2-7). Ein Komplex aus ORC, Cdc6 und MCM bildet die *pre-RC* am Ende der Mitose, nach der Trennung der Schwesterchromatiden (Diffley, 1996). Ein weiterer Faktor, der für die Anlagerung des MCM-Komplexes benötigt wird, ist Cdt1, das vermutlich eine mit Cdc6 koordinierte Funktion übernimmt (Nishitani *et al.*, 2000). Zu Beginn der S-Phase erfolgt die Transformation der *pre-RC* zu Initiationskomplexen (IC) durch die Aktivität der S-Phase-spezifischen Cyclin-abhängigen Kinasen (S-Cdks) und Dbf4-abhängigen Kinasen (DDKs). Dieser Transformationsprozess benötigt außerdem Cdc45 (Zou *et al.*, 1997, Owens *et al.*, 1997, Tercero *et al.*, 2000), dessen Beladung an Chromatin von der Aktivität S-Cdks bzw. DDKs abhängig ist (Mimura & Takisawa, 1998, Zou & Stillman, 2000). Im Verlauf dieses Umwandlungsprozesses kommt es zur Freisetzung von Cdc6 und MCM-Proteinen aus den *pre-RC* während DNA Polymerasen und andere Replikationsfaktoren, wie RPA, in Abhängigkeit von Cdc45 zu den Replikationsursprüngen rekrutiert werden (Mimura *et al.*, 2000). *In vitro* ist gezeigt, dass humanes Cdc45 Mcm7 und DNA Pol α /Prim bindet (Kukimoto *et al.*, 1999). DNA Pol α /Prim synthetisiert die erste RNA am Replikationsursprung für die Leitstrangsynthese bzw. für Okazakifragmente bei der Folgestrangsynthese. Diese RNA-Primer werden wiederum von den anderen replikativen Polymerasen δ und ϵ als Startstellen genutzt.

Eine ähnlich zentrale Rolle wie Cdc45 scheinen auch die Hefepoteine Dpb11 und Rad4/Cut5 und Xmus101/cut5 in *Xenopus* bei Rekrutierung von Replikationsfaktoren an den Initiationskomplex einzunehmen. Beide Hefepoteine sind essentiell für die Replikation, Defekte im *DPB11*-Gen führen in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen zu Hypersensibilität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien und zum Verlust des Rad53-abhängigen *checkpoint*-Signalweges (Araki *et al.*, 1995, Wang & Elledge, 1999, Kamimura *et al.*, 1998). In *Xenopus* ist die Chromatinbindung von Xmus101/cut5 Voraussetzung für die Aktivität von Cdc45 und der DNA-Polymerasen (Van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003).

In Säugerzellen sind die Signalkaskade die zur DNA-Replikation führt und die Mechanismen zu deren Kontrolle noch weitestgehend unklar. Mäkinenmi *et al.* (2001) diskutierten eine mögliche Beteiligung von TopBP1 in frühen Phasen des Replikationsprozesses. Durch die Analyse der Dynamik der Chromatinassoziation von TopBP1 im Verlauf des Zellzyklus konnte diese Annahme in der vorliegenden Arbeit unterstützt werden. Dazu wurden HeLa S3-Zellen mittels doppeltem Thymidinblock am G1/S-Übergang synchronisiert und nach dem Entlassen aus dem Zellzyklusblock zu verschiedenen Zeitpunkten, die die S- und G2/M-Phase repräsentierten, geerntet. Unter Anwendung einer biochemische Fraktionierungsmethode nach Mendez & Stillman (2000) wurden die Zellbestandteile aufgetrennt und die unlösliche, Chromatin-angereicherte sowie die lösliche zytoplasmatische Fraktion im Western Blot analysiert. Zur Kontrolle des Erfolgs der

Fraktionierung wurde Mek2 als Marker für die zytoplasmatische Fraktion verwendet. Mek2 ist eine ausschließlich im Zytoplasma lokalisierte Kinase, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist (Zheng & Guan, 1994). In dieser Arbeit wurde der Hauptanteil von Mek2 ebenfalls in der löslichen Zellfraktion nachgewiesen, Spuren wurden jedoch auch in der unlöslichen Fraktion detektiert. Daraus ist zu schließen, dass die Chromatin-angereicherte Fraktion geringfügige Verunreinigungen mit zytoplasmatischen Proteinen aufwies, die trotz eines zusätzlichen Waschschrittes nicht vollständig beseitigt werden konnten. Trotzdem lassen sich Aussagen zu der subzellulären Verteilung von TopBP1 treffen, denn es war wie Orc2 lokalisiert. Übereinstimmend mit den Literaturdaten war das gesamte Orc2 während aller getesteten Zellzyklusphasen Chromatin-assoziiert (Mendez & Stillman, 2000, Stoeber *et al.*, 2001), wie es auch für das Hefe-Homologe berichtet worden ist (Ogawa *et al.*, 1999). Somit waren mögliche Verunreinigungen mit Zytoplasmaproteinen dafür nicht relevant. Im Gegensatz zu Orc2 fluktuierte die Menge von Chromatin-assoziierten TopBP1 im Verlauf des Zellzyklus. Die größte Menge war zu Beginn der S-Phase in dieser Fraktion detektierbar und nahm mit Eintritt in die G2/M-Phase ab. Ein Expressionspeak von TopBP1 in der S-Phase wurde bereits nach Serumstimulation hungernder Zellen beschrieben (Mäkinemi *et al.*, 2001, Yamane *et al.*, 2002). Möglicherweise geht die erhöhte TopBP1-Expression zu Beginn der S-Phase mit einer größeren Menge Chromatin-assoziierten TopBP1 einher. Das könnte ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung von TopBP1 an der Initiation der DNA-Synthese sein. Die Wachstum-regulierte Expression von TopBP1 unterliegt der Kontrolle durch E2F1, wenn die Zellen in die G1/S-Phase eintreten bzw. der Kontrolle durch E2F4, wenn sie sich in der G0/G1-Phase befinden (Yoshida & Inoue, 2004). Damit wird die TopBP1-Expression durch den gleichen Mechanismus reguliert wie Mcm10 (Yoshida & Inoue, 2004). Mcm10 wurde ursprünglich in *Saccharomyces cerevisiae* als essentieller DNA-Replikationsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Assoziation der pre-RC übernimmt, identifiziert (Überblick in Lei & Tye, 2001). Dort interagiert das Protein genetisch mit ORC, Cdc45, und DNA Polymerasen α und ϵ (Kawasaki *et al.*, 2000). Das humane Mcm10 interagiert mit Orc2 und wird für die Ladung des Mcm2-7-Komplexes an Replikationsursprünge benötigt (Izumi *et al.*, 2000). In *Xenopus* hingegen ist die Bindung von Mcm10 an Replikationsursprünge von der vorherigen Bindung von Mcm2-7 an das Chromatin abhängig. Außerdem verhindert eine Depletion von Mcm10 die Assoziation von Cdc45 und RPA an Replikationskomplexe (Wohlschlegel *et al.*, 2002). Zusätzlich zu Mcm10, S-Cdk und Cdc7 wurde auch für Xmus101/cut5 im zellfreien System gezeigt, dass es Cdc45 rekrutiert. In diesem System konnte außerdem eine geringe Menge p60-Untereinheit der Polymerase ϵ mit Xmus101/cut5 aus der Chromatinfraktion koimmunopräzipitiert werden. (Van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003).

Durch die Koimmunopräzipitation von TopBP1 und Cdc45 aus Lysaten synchronisierter S-Phase HeLa S3-Zellen, konnte in der vorliegenden Arbeit für das humane System eine Verbindung von

TopBP1 zur Replikationsinitiation weiter unterstützt werden. Es lässt sich damit jedoch nicht eindeutig bestimmen, ob die Interaktion direkt stattfindet oder die Proteine als Bestandteil eines größeren Komplexes kopräzipitiert wurden. Der *in vitro* Interaktionsassay mit GST-TopBP1-Fusionsprotein und radioaktiv markiertem Cdc45 konnte darüber ebenfalls keinen eindeutigen Aufschluss geben, da das detektierte Signal sehr schwach war. Zum einen könnte die Ursache in der Qualität des affinitätsaufgereinigten TopBP1-Fusionsproteins liegen. Zum anderen könnte das Ergebnis auch bedeuten, dass die beiden Proteine nicht direkt miteinander wechselwirken sondern im Komplex mit anderen, an der Replikation beteiligten Proteinen, aus dem Lysat kopräzipitiert werden. Sowohl TopBP1 als auch Cdc45 interagieren *in vivo* mit Pol ϵ (Mäkinen *et al.*, 2001, C. Bauerschmidt, IMB, Jena, persönliche Mitteilung). Es wäre vorstellbar, dass Pol ϵ als Bestandteil eines Komplexes mit TopBP1 und Cdc45 deren Kopräzipitation vermittelt. Möglicherweise ist für eine effiziente Interaktion von TopBP1 und Cdc45 aber auch eine postrtranslationale Modifikation wichtig. Nahe liegend wäre z.B. der Einfluss einer Phosphorylierung von Cdc45, da BRCT-Domänen, die als Interaktionsflächen dienen könnten, bevorzugt Phosphoproteine binden (Manke *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2003, Rodriguez, *et al.*, 2003). Es wurde bereits im *Xenopus*-System gezeigt, dass die Aktivität der S-Cdks bzw. DDKs für die Chromatinbeladung von Cdc45 benötigt wird (Mimura & Takisawa, 1998). *In vitro*-Studien demonstrierten die Phosphorylierung von Cdc45 und der katalytischen Untereinheit der DNA Pol α /Prim aus *Saccharomyces cerevisiae* durch DDK (Weinreich & Stillman, 1999, Nougarede *et al.*, 2000). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde der GST-pull down Versuch außer mit dem Cdc45-*in vitro* Translatat auch mit HeLa-Zellextrakten durchgeführt. Bei diesem experimentellen Ansatz kam es jedoch zu starken unspezifischen Bindungen des Cdc45-Proteins an die Glutathion-Sepharose. Aus diesem Grund können dazu keine weiteren Aussagen gemacht werden.

TopBP1, Cdc45 und DNA Pol α /Prim nehmen vermutlich eine Schlüsselstellung bei der Umwandlung von pre-RC zu aktiven IC der DNA-Replikation ein. TopBP1 und Cdc45 liegen *in vivo* in einem Komplex vor, eine direkte Interaktion konnte hier noch nicht klar nachgewiesen werden. Für das weitere Verständnis der Reihenfolge bei der Formation replikativer Komplexe in Säugerzellen, deren Aktivierung und der damit verbundenen Kontrollmechanismen können die Aufklärung dieser Frage und das Auffinden weiterer Partnerproteine in diesem funktionellen Komplex von wesentlicher Bedeutung sein. Analog zum Hefe-System wären Untersuchungen zu dem mit DNA Pol α /Prim interagierenden Mcm10 (Fien *et al.*, 2004, Ricke & Bielinsky, 2004) und dem replikativen Helicase-Komplex Mcm2-7 besonders interessant. Auf der Ebene der Assoziation replikativer Komplexe laufen vielfältige Faktoren und Signale zusammen und nehmen Einfluss auf die DNA-Synthese. Für TopBP1 wäre dabei eine Funktion als *scaffold*-Protein vorstellbar, das in Abhängigkeit der physiologischen Bedingungen verschiedene Proteine bindet oder freisetzt.

Dadurch könnte die DNA-Synthese mit Signalen aus Prozessen der DNA-Schadenserkennung bzw. DNA-Reparatur abgestimmt werden. Die Identifizierung von Cdc45 und PARP-1 als neue Interaktionspartner von TopBP1 in ungestressten Zellen liefert die Basis für weiterführende Experimente in denen die funktionelle Bedeutung dieser Wechselwirkungen sowohl nach Synchronisation als auch nach Behandlung mit genotoxischen Agenzien analysiert werden soll.

4.3 Die Folgen eines TopBP1 *knock down* durch RNA-Interferenz

Mit Hilfe von so genannten *checkpoint* Signalwegen wird die genomische Integrität von Zellen aufrechterhalten, indem im Fall von DNA-Schäden der Zellzyklus arretiert wird und DNA-Reparaturmechanismen ausgelöst werden oder bei exzessiven Schädigungen Apoptose induziert wird, um genetisch instabile Zellen zu eliminieren. Dazu haben Eukaryoten ein kompliziertes Netzwerk molekularer Mechanismen entwickelt, welches fehlerhafte DNA-Strukturen erkennt, das Alarmsignal in der Zelle verbreitet und durch die koordinierte Aktivität von Effektormolekülen die entsprechende Antwort in Gang setzt (Hartwell & Weinert, 1989, Zhou & Elledge, 2000, Hoeijmakers, 2001). Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Identifizierung beteiligter Signalproteine und deren Reihenfolge in den Kaskaden gemacht worden sind, ist davon auszugehen, dass es weitere Komponenten gibt, die an diesen Signalwegen teilnehmen. Viele bekannte Komponenten dieser Wege sind über die Evolution konserviert (Zhou & Elledge, 2000). In der Literatur wird die Teilnahme der homologen Proteine *Schizosaccharomyces pombe* Cut5/Rad4 (Saka *et al.*, 1993, 1994, Marchetti *et al.*, 2002), *Saccharomyces cerevisiae* Dpb11 (Wang & Elledge, 1999, 2002), *Drosophila* Mus101 (Yamamoto *et al.*, 2000) und *Xenopus* Xmus101/cut5 (Parrilla-Castellar & Karnitz, 2003) an diesen Signalkaskaden diskutiert. Das homologe humane Protein TopBP1 weist neben Verbindungen zur Replikation (siehe Abschnitt 4.2) auch Kontakte zum G1/S-*checkpoint* (Herold *et al.*, 2002, Wanzel *et al.*, 2005, Osborn *et al.*, 2002) und dem G2/M-*checkpoint* (Mäkinen *et al.*, 2001, Greer *et al.*, 2003, Yamane *et al.*, 2003) auf.

Die genaue biochemische Funktion von TopBP1 bei diesen Prozessen ist aber nach wie vor weitgehend unklar. Es existieren Hinweise, dass TopBP1 direkt oder indirekt, in Kooperation mit weiteren Faktoren, Einfluss auf die Genexpression nehmen kann. Die beiden N-terminalen BRCT-Domänen von TopBP1 transaktivieren im Zwei-Hybrid-System in der Hefe das *lacZ* Reportergen, wenn sie mit der DNA-Bindedomäne LexA fusioniert sind (Mäkinen *et al.*, 2001). Boner *et al.* (2002) demonstrierten erstmals, dass TopBP1 als transkriptioneller Koaktivator fungieren kann, wenn es durch die Interaktion mit HPV16 E2 zu einem Promotor rekrutiert wird. Dabei war TopBP1 jedoch weder für die transkriptionellen noch für die replikativen Eigenschaften von E2 essentiell. Im Gegensatz dazu inhibiert TopBP1 als Korepressor die transkriptionelle Aktivität von

E2F1 indem es Brg1/Brm, eine zentrale Komponente des Chromatin umwandelnden SWI/SNF-Komplexes, zu E2F1-empfindlichen Promotoren rekrutiert (Liu *et al.*, 2004). Außerdem wird durch die Bindung von TopBP1 an den Transkriptionsfaktor Miz1 dessen Aktivität gehemmt (Herold *et al.*, 2002).

Um neue Erkenntnisse über die Funktion von TopBP1 zu erhalten, wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Konsequenzen eine Abregulation von TopBP1 in Kolonkarzinomzellen mit Wildtypallelen für p53 auf Ebene der Transkription hat, und zwar unter normalen Bedingungen sowie nach Behandlung mit dem genotoxischen Agens Adriamycin. Dazu wurde eine RNAi-Technologie angewandt, die auf einem DNA-Vektor (pSUPER) basiert (Brummelkamp *et al.*, 2002). In diesen Vektor wurde eine TopBP1-spezifische DNA-Matrize kloniert, die *in vivo* zur Synthese von siRNA genutzt wird (pSUPER-TopBP1). Ls174T-Zellen wurden mit pSUPER bzw. pSUPER-TopBP1 und einem Vektor, der den Puromycin-Resistenzmarker enthält, transfiziert und selektioniert. Während pSUPER keinen Effekt auf die endogene TopBP1-Expression hatte, war sie nach Transfektion mit pSUPER-TopBP1 um 80-90% reduziert, wie Western Blot-Analysen ergaben. Die Cdk2-Proteinmenge wurde hingegen nicht beeinflusst. Das deutet darauf hin, dass der beobachtete RNAi-Effekt TopBP1-spezifisch ist.

Mit Hilfe von DNA Mikroarray-Experimenten wurde die Genexpression in TopBP1 *knock down*-Zellen mit der in Kontrollzellen verglichen. Die Analyse zeigte, dass ein Großteil der verändert exprimierten Gene abreguliert war. Darunter waren Gene mit Funktionen bei Signaltransduktionsprozessen wie *KIT*, *MAP3K2*, *PAK2*, *PPP1R10*, *EPS8* und im speziellen die zur Ras-Superfamilie gehörenden Gene *RAB6A*, *SOS1*, *VAV3*. Weiterhin waren Gene betroffen, die für Proteine codieren, welche bei der Transkription und deren Regulation eine Rolle spielen: *POLR2A*, *GTF2H3*, *TCEA1*, *CDK9*, *ICSBP1*, *SLC38A2*, *SF1*. Zu den abregulierten Genen gehörten auch *HIF0*, *H2BE* sowie *CCND2*, deren Produkte an der Chromatinorganisation bzw. Zellzyklusregulation beteiligt sind. In der Gruppe der abregulierten Gene waren ebenso *ALDOC*, *PDP* und *CADPS*, *TMP21* zu finden. Deren Genprodukte stehen mit dem Glukosemetabolismus respektive Transportvorgängen in Verbindung.

Wenige Gene waren in TopBP1 *knock down*-Zellen aufreguliert. Dazu zählten *HSPE1*, *HSPH1* und vier verschiedene Metallothioningene. Vermutlich sind die entsprechenden Proteine an der zellulären Antwort gegenüber Stress beteiligt.

Ob es sich bei diesen Genen um direkte Zielgene von TopBP1 handelt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Hinweise, dass TopBP1 selbst transaktivierend wirkt, gibt es bisher nur aus dem Hefe-Zwei-Hybridsystem (Makiniemi *et al.*, 2001). Wahrscheinlicher sind sekundäre Effekte, die TopBP1 durch die Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie z.B. Miz1

oder E2F1 entwickeln kann. TopBP1 kann als Korepressor von E2F1 wirken (Liu *et al.*, 2004). E2F1 gehört zur Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren, die sechs verschiedene Proteine umfasst (E2F1-E2F6) und die eine Heterodimerisierung mit DP-Proteinen für ihre Funktionalität benötigen. Innerhalb der E2F-Familie fungieren E2F1, E2F2 und E2F3 als transkriptionelle Aktivatoren und E2F4 bzw. E2F5 als Transkriptionsrepressoren. Als Reaktion auf Wachstumssignale phosphorylieren Cyclin-abhängige Kinasen das Retinoblastomprotein (Rb), wodurch E2F aus der Rb-Bindung freigesetzt wird und aktiv werden kann. Dieser Vorgang ist wichtig für die Kontrolle des G1/S-Überganges (Überblick in Dyson, 1998). Jedes E2F-Mitglied zeigt spezifische biologische Eigenschaften. Die E2F1-Aktivität spielt eine Rolle bei der Apoptose-Induktion und damit bei der Vermeidung einer Transformation bei oncogenem Stress (Pan *et al.*, 1998, Lin *et al.*, 2001). E2F1 wird bei DNA-Schädigung durch ATM und Chk2 phosphoryliert, stabilisiert und aktiviert (Lin *et al.*, 2001). Liu *et al.* (2003) schlagen anhand der Korepressorfunktion von TopBP1 ein Modell vor in dem TopBP1 die Rolle zugesprochen wird, die E2F1-Aktivität und damit E2F1-vermittelte Apoptose bei normalem Wachstumsbedingungen und bei DNA-Schädigung zu unterdrücken, um eine DNA-Reparatur zu ermöglichen. Ausgehend von diesem Modell würde eine Depletion von TopBP1 zur Aktivierung der Expression von E2F1-Zielgenen führen. Liu *et al.* (2003) haben das anhand von HEK293-, T98G- und NIH3T3-Zellen gezeigt. Dort wurden die E2F1-Zielgene E2F1, Cyclin E, p73, Pockettprotein p107 und TK nach TopBP1 *knock down* exprimiert. Dieser Effekt wurde durch die Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Substanzen (NCS, Adriamycin) verstärkt. Außerdem wurde demonstriert, dass TopBP1-siRNA in diesen Zellen E2F1-abhängig Apoptose induziert.

Im Gegensatz dazu lieferte die Auswertung unserer Mikroarray-Daten keine Hinweise auf eine Induktion von E2F1-Zielgenen bzw. Apoptose nach TopBP1-Depletion durch RNA-Interferenz. Weder die von Lui *et al.* (2003) getesteten E2F1-reaktiven Gene, noch die von Ren *et al.* (2002) publizierten E2F1-Zielgene zeigten hier eine verstärkte Expression. Die Diskrepanz der Ergebnisse kann vielfältige Ursachen haben. Zum einen gibt es Unterschiede im experimentellen Design. Liu *et al.* (2003) haben die Auswirkung eines TopBP1-*knock downs* in transient transfizierten Zellen innerhalb von drei Tagen nach Transfektion untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen vor der Analyse zunächst mehrere Tage selektioniert, so dass eine Überlagerung früher Effekte durch spätere denkbar ist. Zum anderen können die Effekte einer TopBP1-Depletion auf das Überleben von Zellen auch von weiteren Faktoren abhängig sein. Die Repression der E2F1-Aktivität durch TopBP1 ist abhängig vom Brg1/Brm-Status. In den Rb- und Brg1/Brm-defizienten C33A-Zellen ist es nicht möglich, durch Depletion von TopBP1 eine E2F1-abhängige Apoptose zu induzieren (Liu *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurden humane Kolonkarzinomzellen (Ls174T) für die Experimente verwendet. Der Brg1/Brm-Status dieser Zellen ist nicht bekannt, kann aber im Hinblick auf eine mögliche E2F1-Korepressorfunktion von TopBP1 auch hier von Bedeutung sein.

Ist beispielsweise die Brg1-Menge konstitutiv gering, kann die Expression von E2F1-Zielgenen einen Stand erreichen, der durch eine Induktion der E2F1-Aktivität nicht steigerbar ist.

Bei der Interpretation der RNA-Interferenz-Versuche muss der mögliche Einfluss eines weiteren Proteins berücksichtigt werden. TopBP1 hat mit BRCA1 gemeinsame Eigenschaften, welche die beiden Proteine auch funktionell verbinden könnten. Beide Proteine besitzen BRCT-Domänen und weisen weitere Sequenzhomologien am C-Terminus auf (Yamane *et al.*, 1997). BRCA1 und TopBP1 werden während der S-Phase induziert. Außerdem sind die beiden Proteine nach DNA-Schädigung Substrate der ATM-Kinase und kolokalisieren mit nukleären Foci (Mäkinen *et al.*, 2001). Der Einfluss von BRCA1 auf die TopBP1-Funktion ist in der Literatur kontrovers beschrieben. Yamane *et al.* (2003) erzeugten mit Hilfe von *antisense* Morpholino-Oligomeren gegen TopBP1 in einer BRCA1-mutierten Brustkrebszelllinie (HCC1937) doppelt negative Bedingungen. Die so veränderten Zellen wiesen im Vergleich zu Kontrollzellen ein vermindertes Koloniewachstum auf und induzierten nach γ -Bestrahlung vermehrt Apoptose. Eine Transfektion mit Wildtyp *BRCA1* verhinderte diese Effekte, was bedeuten kann, dass die beiden Proteine überlappende Funktionen besitzen. In früheren Experimenten, in denen HeLa-Zellen mit diesen *antisense*-Sequenzen gegen TopBP1 transfiziert wurden, beobachtete Yamane *et al.* (2002) hingegen ein beeinträchtigtes Koloniewachstum und verstärkte Apoptose unabhängig von exogen induzierten DNA-Schäden. HeLa-Zellen exprimieren jedoch funktionelles BRCA1 (Reini *et al.*, 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vergleichbare Versuche durchgeführt, in denen neben Ls174T-Zellen auch HeLa-Zellen hinsichtlich ihres Koloniewachstums nach TopBP1 *knock down* im Langzeitversuch mit und ohne exogen induzierten DNA-Schäden untersucht wurden. Bei beiden Zelllinien war das Wachstum in Abwesenheit von DNA-Schäden nicht beeinträchtigt, während die Koloniebildung nach Schädigung der DNA in TopBP1-depletierten Zellen verglichen mit Kontrollzellen signifikant reduziert war. Die alleinige Abregulation von TopBP1 in den Zellen reichte demnach nicht aus, um einen Zellzyklusarrest oder Apoptose zu induzieren. Diese Ergebnisse unterstützen wiederum die Hypothese, dass TopBP1 in Kooperation mit anderen Faktoren mit ähnlichem Funktionsspektrum zelluläre Prozesse, wie z.B. Replikation und Zellzykluskontrolle, reguliert und dass das Ausschalten von TopBP1 die Zellen gegenüber DNA-Schäden empfindlicher macht.

Van Haaften *et al.* (2004) demonstrierten ähnliches in *C. elegans*. Wurden Wildtyp-Tiere mit RNAi gegen das TopBP1-homologe Protein F37D.6 behandelt, starben diese Würmer nicht. Mutierte Tiere, die verstärkt DSB aufwiesen, zeigten nach Behandlung mit der gleichen RNAi eine verstärkte Letalität.

Als Ursache divergierender Ergebnisse bei der Anwendung von verschiedenen siRNAs und *antisense*-Sequenzen werden auch mögliche *off-target* Effekte diskutiert (Jackson *et al.*, 2003, Scacheri *et al.*, 2004). Demnach ist es möglich, dass siRNAs zur Abregulation von Nicht-Zielgenen führen können, die nur in 11 von 21 Nukleotiden mit der siRNA übereinstimmen (Jackson *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit verwendete siRNA-Sequenz wurde mit den bekannten, in der Datenbank enthaltenen Genen abgeglichen und wies keine entsprechenden Ähnlichkeiten, außer mit dem Zielgen TopBP1, auf. Für eine genauere funktionelle Beurteilung von TopBP1 ist es offensichtlich notwendig, die verwendeten siRNA-Sequenzen und Zellsysteme aufeinander abzustimmen bzw. genauer zu definieren.

Ausgehend von dem Modell, dass eine Fraktion von Miz1 in ungestressten Zellen inaktiv im Komplex mit TopBP1 vorliegt und nach DNA-Schädigung aus dem Komplex freigesetzt wird, wodurch die Aktivierung bzw. Repression von Miz1-Zielgenen und damit ein Zellzyklusarrest erreicht wird (Herold *et al.*, 2002, Wanzel *et al.*, 2005), kann folgende Hypothese aufgestellt werden: eine gezielte Abregulation von TopBP1 führt zur Freisetzung von Miz1 und damit zur Aufregulation bzw. Abregulation von bekannten Miz1-Zielgenen ähnlich wie bei der Reaktion von Zellen auf DNA-Schäden. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die Ergebnisse dieser Arbeit mit Daten aus dem Labor M. Eilers (persönliche Mitteilung S. Herold, IMT, Marburg, teilweise veröffentlicht in Wanzel *et al.*, 2005) verglichen, für die Miz1 in Ls174T-Zellen abreguliert wurde. In Abwesenheit von DNA-Schäden waren in Miz1 *knock down*-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nur wenige Gene verändert, die keine signifikanten Parallelen zu TopBP1 *knock down*-Zellen aufwiesen.

Wurden die Miz1 *knock down*-Zellen und die Kontrollzellen mit Adriamycin behandelt, was zur Freisetzung von Miz1 führt, waren 75 (526) Gene um mehr als das Zweifache (1,5fache) verändert. Dabei führte die Abregulation von Miz1 sowohl zur reduzierten als auch verstärkten Expression von Genen (Wanzel *et al.*, 2005). Der Vergleich mit TopBP1 *knock down*-Zellen ergab für 15 von 58 Genen, deren Expression in TopBP1 *knock down*-Zellen relativ zu Kontrollzellen verändert war, eine gegensätzliche Regulation. Das heisst, diese 15 Gene waren in TopBP1 *knock down*-Zellen, in denen Miz1 freigesetzt ist, verglichen mit Kontrollzellen, in denen Miz1 im Komplex mit TopBP1 vorliegt, abreguliert. Die gleichen Gene waren nach DNA-Schädigung in Miz1 *knock down*-Zellen verglichen mit Wildtyp-Miz1-Zellen aufreguliert. In Wildtyp-Zellen wird Miz1 im Fall von DNA-Schädigungen (z.B. durch Adriamycin-Behandlung) aus dem inhibitorischen Komplex mit TopBP1 freigesetzt und wirkt als Transkriptionaktivator bzw. Repressor (Herold *et al.*, 2002). In Miz1 *knock down*-Zellen ist diese Funktion unterdrückt, da Miz1 fehlt.

Unter den betroffenen Genen befanden sich z.B. Gene, die für Proteine codieren, welche bei Prozessen wie Glucosemetabolismus (*PDP*, *ALDOC*), Transkription (*POLR2*, *GTF2H3*,

SLC38A2), Signaltransduktion (*RAB6A*, *SOS1*, *MAP3K2*) und Chromatinorganisation (*HIF0*, *H2BE*) eine Rolle spielen. Wurden die TopBP1 *knock down*-Zellen ebenfalls mit Adriamycin behandelt, wiesen weitere sechs Gene eine Abregulation auf, während sie in Miz1 *knock down*-Zellen aufreguliert waren (z.B. *GLE1*, *CS*, *NCL*).

In Wanzel *et al.* (2005) wird demonstriert, dass Miz1 vermutlich an zwei verschiedenen Programmen der Genexpression beteiligt ist, die nach DNA-Schädigung ausgelöst werden. Einerseits wird Miz1 für die Aktivierung einer Gengruppe benötigt. Die Aktivierung dieser Gene kann wiederum durch Myc reprimiert werden. Andererseits reprimiert Miz1 eine andere Gruppe von Genen, wobei diese Funktion von Miz1 durch das Protein 14-3-3 η reguliert wird. Gene, die gemeinsam von Miz1 und Myc reguliert werden, waren in TopBP1 *knock down*-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nicht unterschiedlich exprimiert. Von der Abregulation von TopBP1 waren jedoch Gene betroffen, die auch gemeinsam durch Miz1 und 14-3-3 η reguliert werden. Darunter waren *GLE1*, *PDP*, *CS*, *ALDOC*, *TDE1*, *RAB6A*.

Vor diesem Hintergrund ist folgende Interpretation, die Rolle von TopBP1 betreffend, denkbar: da es bei Verlust von TopBP1 zur Abregulation von Genen kommt, die in Miz1 *knock down*-Zellen bei DNA-Schädigung aufreguliert sind, beeinflusst TopBP1 die Repressoraktivität von Miz1 negativ, indem es in ungestressten Zellen, möglicherweise kooperativ mit 14-3-3 η , Miz1 hemmt. Das heißt, fehlt TopBP1, könnte die Hemmung von Miz1 durch 14-3-3 η ineffizient sein, wodurch es zur Repression von Miz1-Zielgenen kommt. DNA-Schäden verstärken diesen Effekt. Das deutet darauf hin, dass mit der Abregulation von TopBP1 die Antwort der Zelle auf DNA-Schädigung zumindest teilweise imitiert wird.

Die Bindung und regulative Aktivität von 14-3-3 η bezüglich Miz1 ist abhängig von der Phosphorylierung von Miz1 durch Akt. Stromaufwärts im Signalweg der Akt-Kinase agiert die PI3-Kinase. Wird deren Aktivität spezifisch gehemmt, kommt es nach Adriamycinbehandlung ebenfalls zur Abregulation von Miz1-Zielgenen (Wanzel *et al.*, 2005).

Für einen Proliferationsarrest in ungestressten Zellen ist die Abregulation von TopBP1 jedoch nicht ausreichend, wie der Koloniebildungstest zeigte. Wie oben beschrieben, war das Wachstum von Ls174T- und HeLa-Zellen nach TopBP1-Abregulation im Vergleich zu Kontrollzellen mit normalem TopBP1-Gehalt nicht beeinträchtigt. Western Blot Analysen dieser Zellen zeigten außerdem, dass die Expression von dem Zellzyklus-Inhibitor p21^{CIP1} in diesen Zellen nicht verändert war (Daten nicht gezeigt). Die Aktivierung der *P21CIP1*-Expression durch Miz1 wird sowohl über Myc als auch über 14-3-3 η reguliert. Beide Proteine sind individuell in der Lage, einen Miz1-induzierten Proliferationsstopp zu überwinden (Wanzel *et al.*, 2005). Außerdem ist auch eine Aktivierung von p53 für die Induktion der *P21CIP1*-Expression notwendig. Dies geschieht erst nach Stresseinwirkung (Deng *et al.*, 1995). Überlappende Funktionen der

Regulationsmechanismen am *P21CIP1*-Promotor könnten das Wachstum von Zellen in Abwesenheit von DNA-Schäden sicherstellen.

Wurden in den TopBP1 *knock down*-Zellen durch Behandlung mit Adriamycin (Ls174T) bzw. UV-B-Strahlung (HeLa) DNA-Schäden induziert, bildeten diese Zellen in der vorliegenden Arbeit signifikant weniger Kolonien als gleich behandelte Kontrollzellen. Der gleiche Effekt wurde in NIH3T3-Zellen beobachtet, bei denen Wildtyp-Miz1 durch mutiertes Miz1 ersetzt wurde. Aufgrund der Mutation (S428A) wird die Phosphorylierung durch Akt und damit die Bindung von 14-3-3 η verhindert (Wanzel *et al.*, 2005). Das Koloniewachstum dieser Zellen war im Vergleich zu Wildtyp-Miz1 enthaltenden Zellen stark vermindert. Die Zellen waren hier nicht in der Lage den Miz1-induzierten G1-Arrest zu überwinden (Wanzel *et al.*, 2005). Diese Daten unterstützen die Annahme, dass auch TopBP1 auf dieser Ebene der Miz1-Regulation eingreifen und als Korepressor kooperativ mit 14-3-3 η gegenüber Miz1 wirken könnte.

Auf welche Weise die Genrepression durch Miz1 zum Stopp der Zellproliferation nach DNA-Schädigung beiträgt und wie erreicht wird, dass TopBP1 überwiegend dieses Programm der Miz1-Regulation beeinflusst, muss noch in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine hohe Komplexität und Redundanz bei der Regulation des Zellzyklus, wobei TopBP1 Funktionen bei der DNA-Replikation und DNA-Schadensantwort übernimmt und möglicherweise mit weiteren Faktoren teilt. Dadurch könnte TopBP1 an der Koordination dieser Prozesse und damit an der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität teilhaben.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit identifiziert zwei neue Interaktionspartner von TopBP1 und bietet mehrere interessante Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen, auf die zum Teil bereits in der Diskussion kurz eingegangen wurde.

Die Wechselwirkung mit Cdc45 in Koimmunopräzipitationen liefert einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von TopBP1 bei der Initiation der DNA-Synthese. Der eindeutige Nachweis einer direkten Interaktion muss anhand von *in vitro*-Experimenten der rekombinanten Proteine noch erfolgen und könnte vom Phosphorylierungsstatus von Cdc45 abhängig sein. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die beiden Proteine in einem Multiproteinkomplex assoziieren und die Interaktion über weitere Partnerproteine vermittelt wird. Neben Polymerase ϵ kommt auch PARP-1 für eine solche Vermittlerrolle in Frage, denn PARP-1 kann auch mit Cdc45 kopräzipitiert werden

(eigene Daten, nicht gezeigt) und wurde bereits in Replikationskomplexen nachgewiesen (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1996).

Über die genaue biologische Bedeutung der Interaktion von TopBP1 mit PARP-1 ist bisher noch nichts bekannt. Näheren Aufschluss darüber könnten Interaktionsstudien in gestressten Zellen mit und ohne Behandlung mit spezifischen PARP-1-Inhibitoren bringen. Von besonderem Interesse ist hierbei die Auswirkung einer solchen Behandlung auf die Dissoziation des Miz1-TopBP1-Komplexes nach UV-Bestrahlung. Mit Hilfe der Deletion der ADP-Ribosylierungsregion von TopBP1 kann außerdem untersucht werden, ob Überexpression dieses TopBP1-Derivats Zellen unempfindlich gegenüber UV-Stress machen kann.

Die Genexpressionsanalysen von TopBP1 *knock down*-Zellen deuten an, dass TopBP1 vor allem die genreprimierenden Funktionen von Miz1 beeinflusst, ein Programm, dass auch durch Akt/14-3-3 η reguliert wird. Chromatinimmunpräzipitationen sollen in Zukunft zeigen, ob in TopBP1-abregulierten Zellen Miz1 verstärkt an die Promotoren von z.B. den Genen *PDP*, *ALDOC*, *CS* oder *GLE1* bindet.

Proteine mit BRCT-Domänen binden ihre Interaktionspartner bevorzugt über phosphorylierte Reste (Manke *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2003). Im Hinblick auf eine mögliche Korepressorfunktion von TopBP1 mit 14-3-3 η wäre interessant, ob die TopBP1-Bindung an Miz1 ebenfalls Phosphorylierungs-abhängig ist und ob sich die Array-Daten auf Proteinebene mittels 2D-Gelanalysen zunächst im gleichen zellulären System bestätigen lassen.

5. Zusammenfassung

Das Topoisomerase II β -Bindepotein (TopBP1) ist ein humanes Protein mit acht BRCT (BRCA1 Carboxyterminus)-Motiven, dass mit wichtigen zellulären Prozessen wie DNA-Schadensantwort, DNA-Replikation und Apoptose in Verbindung steht. Ein bekannter Interaktionspartner von TopBP1 ist der Transkriptionsfaktor *Myc-interacting zinkfinger protein 1* (Miz1). Eine Fraktion von Miz1 ist in ungestressten Zellen an TopBP1 gebunden und dadurch inhibiert. DNA-Schädigungen führen zur Freisetzung von Miz1 aus dem Komplex mit TopBP1 und damit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors und zum Zellzyklusarrest. Gegenstand dieser Arbeit waren funktionelle Untersuchungen mit dem Ziel, neue Aspekte für die Aufklärung der Rolle von TopBP1 bei der Zellzykluskontrolle, insbesondere im Myc-Miz1-Regulationsnetzwerk, zu finden. Unter Berücksichtigung bekannter Daten über dieses Protein bzw. über strukturell ähnliche oder homologe Proteine aus anderen Organismen wurden zwei neue Protein-Protein-Interaktionen abgeleitet und die Wechselwirkungen *in vitro* und *in vivo* analysiert.

TopBP1 besitzt mit der sechsten BRCT-Domäne eine Proteinregion, die homolog zu der Auto(ADP-Ribosyl)ierungsregion des Enzyms Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1) ist. PARP-1 bindet DNA-Strangbrüche und katalysiert anschließend eine Selbst-ADP-Ribosylierung sowie die Modifikation benachbarter Proteine. In dieser Arbeit konnte anhand von *in vitro* Bindungsassays die Interaktion von Proteinfragmenten von TopBP1 und PARP-1 gezeigt und die Interaktionsflächen der beiden Proteine auf die sechste BRCT-Domäne von TopBP1 und die Automodifikationsdomäne von PARP-1 eingegrenzt werden. Die *in vivo* Assoziation der endogenen Proteine konnte durch Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass TopBP1 *in vitro* durch PARP-1 ADP-ribosyliert wird. Durch diese posttranslationale Modifikation wird eine Möglichkeit aufgezeigt, wie die Bindungseigenschaften von TopBP1 bezüglich Miz1 verändert werden können, so dass es zur Freisetzung im Fall von DNA-Schädigung zur von Miz1 kommt.

Aus anderen Eukaryoten wie Hefen oder *Xenopus laevis* ist die Beteiligung der entsprechenden TopBP1-homologen Proteine (Rad4/Cut5, Dpb11, Xmus101/cut5) an der Initiation der Replikation durch Interaktionen mit DNA-Polymerasen und dem Initiationsfaktor Cdc45 bekannt. In humanen Zellen ist die TopBP1-Expression in der S-Phase am größten und die Bindung von Pol ϵ bereits nachgewiesen. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Funktionen von TopBP1 evolutionär konserviert sind. In dieser Arbeit wurden Zellfraktionierungsversuche mit synchronisierten HeLa S3-Zellen durchgeführt, die zeigten, dass TopBP1 in humanen Zellen Chromatin-assoziiert vorliegt, wobei der TopBP1-Anteil in dieser Fraktion zu Beginn der S-Phase am größten ist. Weiterhin konnte durch Koimmunopräzipitation der endogenen Proteine eine Assoziation von

TopBP1 und Cdc45 gezeigt werden. Ob die Bindung der beiden Proteine direkt erfolgt konnte im *in vitro* Bindeassay nicht eindeutig geklärt werden. Es ist möglich, dass TopBP1 und Cdc45 als Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, was Replikationskomplexe darstellen, kopräzipitieren.

Genexpressionstudien zeigten, dass sich die gezielte Abregulation der TopBP1-Expression in Ls174T-Zellen mit Hilfe von RNA-Interferenz, auf die Expression einer Gruppe von Genen auswirkt, die durch Miz1 nach DNA-Schädigung reprimiert wird. Damit beeinflusst TopBP1 genreprimierende Funktionen von Miz1, die auch durch Akt/14-3-3 η reguliert werden, nicht jedoch durch Myc. Zu prüfen bleibt, ob TopBP1 und 14-3-3 η diese Miz1-Funktionen kooperativ regulieren. Zellwachstumsversuche von TopBP1 *knock down*-Zellen zeigten keine Beeinträchtigung ihrer Proliferation in Abwesenheit von exogen induzierten DNA-Schäden im Vergleich mit Kontrollzellen. Werden diese Zellen mit dem genotoxischen Agens Adriamycin behandelt, ist die Koloniebildung bei TopBP1-Abregulation inhibiert.

Zusammengefasst liefert diese Arbeit neue Hinweise für eine Beteiligung von TopBP1 an der Replikationsinitiation und für einen möglichen molekularen Mechanismus, über den die Freisetzung von Miz1 im Rahmen eine DNA-Schadensantwort bewirkt werden kann. Die experimentellen Daten zusammen mit aktuellen Literaturdaten zeigen außerdem, dass TopBP1 die Genrepression durch Miz1, die Teil der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden ist, beeinflusst. Es bleiben offene Fragen zum Beispiel zu Faktoren oder Mechanismen, die in TopBP1 *knock down*-Zellen in Abwesenheit von DNA-Schäden Funktionen dieses Proteins komplementieren können und zu einem normalen Wachstum führen. Diese Fragen und die mögliche Rolle von TopBP1 als Protein, das durch Bindung und Freisetzung von Interaktionspartnern an der Koordination verschiedener zellulärer Prozesse teilnimmt, wird Gegenstand weiterführender Experimente sein.

6. Literaturverzeichnis

- Affar, E.B., Shah, R.G., Poirier, G.G.** (1999): Poly(ADP-ribose) turnover in quail myoblast cells: relation between the polymer level and its catabolism by glycohydrolase. *Mol Cell Biochem* **193**: 127-135.
- Ahmad, K.** (1998): Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12123-12128.
- Alkhatib, H.M., Chen, D.F., Cherney, B., Bhatia, K., Notario, V., Giri, C., Stein, G., Slattery, E., Roeder, R.G., Smulson, M.E.** (1987): Cloning and expression of cDNA for human poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1224-1228.
- Al-Khodairy, F., Carr, A.M.** (1992): DNA-repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **4**: 1343-1350.
- Althaus, F.R.** (2005): Poly(ADP-ribose): a co-regulator of DNA-methylation? *Oncogene* **24**: 11-12.
- Althaus, F.R., Richter, C.** (1987): ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance. *Mol Biol Biochem Biophys* **37**: 1-237.
- Alvarez-Gonzalez, R., Spring, H., Müller, M., Bürkle, A.** (1999): Selektive loss of poly(ADP-ribose) and the 85-kDa fragment of poly(ADP-ribose)polymerase in nucleoli during alkylation-induced apoptosis of HeLa cells. *J Biol Chem* **274**: 32122-32126.
- Ame, J.-C., Spenlehauer, C., de Murcia, G.** (2004): The PARP superfamily. *Bioessays* **26**: 882-893.
- Andreone, T.L., O'Connor, M., Denenberg, A., Hake, P.W., Zingarelli, B.** (2003): Poly(ADP-ribose)polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *J Immunol* **170**: 2113-2120.
- Araki, H., Leem, S.-H., Phongdara, A., Sugino, A.** (1995): Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(ϵ) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11791-11795.
- Augustin, A., Spenlehauer, C., Dumond, H., Menissier-De Murcia, J., Piel, M., Schmit, A.C., Apiou, F., Vonesch, J.L., Kock, M., Bornens, M., De Murcia G.** (2003): PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci.* **116**: 1551-1562.
- Bae, J., Donigia, J.R., Hsueh, A.J.W.** (2003): Tankyrase 1 interacts with Mcl-1 proteins and inhibits their regulation of apoptosis. **278**: 5195-5204.
- Baer, M., Nilsen, T.W., Costigan, C., Altman, S.** (1990): Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucleic Acids Res.* **18**: 97-103.
- Baglioni, C., Nilsen, T.W.** (1983): Mechanisms of antiviral action of interferon. *Interferon* **5**: 23-42.

- Bardwell, V.J., Treisman, R.** (1994): The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* **8**: 1664-1677.
- Bell, S.P., Dutta, A.** (2002): DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, L., Bernards, R.** (2004): A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**: 431-437.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J.** (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.
- Bernstein, E., Denli, A.M., Hannon, G.J.** (2001): The rest is silence. *RNA* **7**: 1509-1521.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Boner, W., Taylor, E.R., Tsirimonaki, E., Yamane, K., Campo, M.S., Morgan, I.M.** (2002): A functional interaction between the human Papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *J Biol Chem* **277**: 22297-22303.
- Bootsma, D.** (1965): Changes induced in the first post-irradiation generation cycle of human cells studies by double labeling. *Exp Cell Res* **38**: 429-431.
- Borden, K.L.B.** (2002): Pondering the Promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* **22**: 5259-5269.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F., Koonin, E.V.** (1997): A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* **11**: 68-76.
- Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., Smulson, M.** (1999): Role of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. *J Biol Chem* **274**: 22932-22940.
- Bowen, H., Lapham, A., Phillips, E., Yeung, I., Alter-Koltunoff, M., Levi, B.-Z., Perry, V.H., Mann, D.A., Barton, C.H.** (2003): Characterization of the murine *Nramp1* promoter. Requirements for transactivation by Miz-1. *J Biol Chem* **278**: 36017-36026.
- Boyd, J.B., Setlow, R.B.** (1976): Characterization of postreplicative repair in mutagen-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **84**: 507-526.
- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Pelicci, P.G., Amati, B., Kouzarides, T., de Launot, Y., Di Croce, L., Fuks, F.** (2005): Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J* **24**: 336-346.
- Brochu, G., Duchaine, C., Thibault, L., Lagueux, J., Shah, G.M., Poirier, G.G.** (1994): Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochim Biophys Acta* **18**: 342-350.

- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R.** (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-553.
- Callbaut, I., Mornon, J.-P.** (1997) : From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Letters* **400**: 25-30.
- Chambon, P., Weill, J.D., Mandel, P.** (1963): Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **11**: 39-43.
- Cherney, B.W., McBride, O.W., Chen, D.F., Alkhatib, H., Bhatia, K., Hensley, P., Smulson, M.E.** (1987): cDNA sequence, protein structure, and chromosomal location of the human gene for poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8370-4.
- Cleaver J.E., Morgan, W.F.** (1991): Poly(ADP-ribose)polymerase: a perplexing participant in cellular response to DNA breakage. *Mutat Res* **257**: 1-18.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., Poirier, G.G.** (1999): Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342**: 249-268.
- Dantzer, F., Nasheuer, H.-P., Vonesch, J.-L., de Murcia, G., Menissier-de Murcia, J.** (1998): Functional association of poly(ADP-ribose)polymerase with DNA polymerase α -primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res* **26**: 1891-1898.
- De Murcia, G., Shall, S.** (Editors) (2000): Poly (ADP-ribosyl)ation reactions: from DNA damage and stress signalling to cell death. Oxford University Press.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., Leder, P.** (1995): Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**: 675-684.
- Desmarais, Y., Menard, L., Lagueux, J., Poirier, G.G.** (1991): Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity. *Biochim Biophys Acta* **1078**: 179-86.
- Dhordain, P., Albagli, O., Lin, R.J., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckeaert, J.P., Evans, R.M., Leprince, D.** (1997): The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10762-10767.
- Diffley, J.F.** (1996): Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev* **10**: 2819-2830.
- Dyson, N.** (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**: 2245-62.
- Eilers, M., Schirm, S., Bishop, J.M.** (1991): The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* **10**: 133-141.
- Eisenman, R.N.** (2001): Deconstructing Myc. *Genes Dev* **15**: 2023-2030.

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J.D., Velculescu, V.E., Burrell, M., Hill, D.E., Healy, E., Rees, J.L., Hamilton, S.R. (1995): Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* **55**: 2910-2919.
- El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., Caldecott, K.W. (2003): A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* **31**: 5526-5533.
- Ferro, A.M., Olivera, B.M. (1982): Poly(ADP-ribosylation) *in vitro*. *J Biol Chem* **257**: 7808-7813.
- Fien, K., Cho, Y.S., Lee, J.K., Raychaudhuri, S., Tappin, I., Hurwitz, J. (2004): Primer utilization by DNA polymerase alpha-primase is influenced by its interaction with Mcm10p. *J Biol Chem* **279**: 16144-16153.
- Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., Lobanenko, V.V. (1996): An exceptional conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* **16**: 2802-2813.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fotedar, R., Mossi, R., Fitzgerald, P., Rousselle, T., Maga, G., Brickner, H., Messier, H., Kasibhatla, S., Hubscher, U., Fotedar, A. (1996): A conserved domain of the large subunit of replication factor C binds PCNA and acts like a dominant negative inhibitor of DNA replication in mammalian cells. *EMBO J* **15**: 4423-33.
- Gaal, J.C., Smith, K.R., Pearson, C.K. (1987): Cellular euthanasia mediated by a nuclear enzyme: a central role for nuclear ADP-ribosylation in cellular metabolism. *Trends Biochem Sci* **12**: 129-130.
- Gartel, A.L., Shchors, K. (2003): Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* **283**: 17-21.
- Gatti, M., Smith, D.A., Baker, B.S. (1983): A gene controlling condensation of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **221**: 83-85.
- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., Eisenman, R.N. (2000): The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 653-699.
- Greer, D.A., Besley, B.D.A., Kennedy, K.B., Davey, S. (2003): hRad9 rapidly binds DNA containing double-strand breaks and is required for damage-dependent topoisomerase II β binding protein 1 focus formation. *Cancer Res* **63**: 4829-4835.
- Guo, S., Kempheus, K.J. (1995): *Par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**: 611-620.

- Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon, G.J.** (2001): Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* **2**: 110-119.
- Hammond, S.M., Bernssein, E., Beach, D., Hannon, G.J.** (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **4**: 557-580.
- Hartwell, L.H., Weinert, T.A.** (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**: 629-34.
- Hashimoto, Y., Takisawa, H.,** (2003): *Xenopus* Cut5 is essential for a CDK-dependent process in the initiation of DNA replication. *EMBO* **22**: 2526-2535.
- Hermeking, H.** (2003): The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev* **3**: 931-943.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H.-P., Haenel, F., Eilers, M.** (2002): Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* **10**: 509-521.
- Hoeijmakers, J.H.** (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374.
- Honda, Y., Tojo, M., Matsuzaki, K., Anan, T., Matsumoto, M., Ando, M., Saya, H., Nakao, M.** (2002): Cooperation of HECT-domain ubiquitin ligase hHYD and DNA topoisomerase II-binding protein for DNA damage response. *J Biol Chem* **277**: 3599-3605.
- Hong, S.J., Dawson, T.M., Dawson, V.L.** (2004): Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 259-264.
- Hunter, S.C., Ohlrogge, J.B.** (1998): Regulation of spinach chloroplast acetyl-CoA carboxylase. *Arch Biochem Biophys.* **359**: 170-178.
- Huyton, T., Bates, P.A., Zhang, X., Sternberg, M.J.E., Freemont, P.S.** (2000): The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mut Res* **460**: 319-332.
- Ikejima, M., Noguchi, S., Yamashita, R., Ogura, T., Sugimura, T., Gill, D.M., Miwa, M.** (1990): The zinc fingers of human poly(ADP-ribose)polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. *J Biol Chem* **265**: 21907-21913.
- Izumi, H., Molander, C., Penn, L.Z., Ishisaki, A., Kohno, K., Funa, K.** (2001): Mechanisms for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor. *J Cell Sci* **114**: 1533-1544.
- Izumi, M., Yanagi, K.-I., Mizuno, T., Yokoi, M., Kawasaki, Y., Moon, K.-Y., Hurwitz, J., Yatagai, F., Hanaoka, F.** (2000): The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G₂ phase. *Nucleic Acids Res* **28**: 4769-4777.
- Jackson, A.L., Linsley, P.S.** (2004): Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* **20**: 521-524.

- Jurvansuu, J., Raj, K., Stasiak, A., Beard, P.** (2005): Viral transport of DNA damage that mimics a stalled replication fork. *J Virol* **79**: 569-580.
- Kamimura, Y., Masumoto, H., Sugino, A., Araki, H.** (1998): Sld2, which interacts with Dpb11 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol* **18**: 6102-6109.
- Kanai, M., Tong, W.-M., Sugihara, E., Wang, Z.-Q., Fukasawa, K., Miwa, M.** (2003): Involvement of poly(ADP-ribose)polymerase 1 and poly(ADP-ribosyl)ation in regulation of centrosome function. *Mol Cell Biol* **23**: 2451-2462.
- Kaplan, J., Calame, K.** (1997): The Z₁N/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression. *Nucleic Acids Res* **25**: 1108-1116.
- Kawaichi, M., Uedam K., Hayaishi, O.** (1981): Multiple autopoly(ADP-ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose)synthetase. Mode of modification and properties of automodified synthetase. *J Biol Chem* **256**: 9483-9.
- Kawasaki, Y., Hiraga, S., Sugino, A.** (2000): Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **12**: 975-989.
- Kenderell, J.R., Carthew, R.W.** (2000): Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotech* **18**: 896-898.
- Kickhoefer, V.A., Stephen, A.G., Harrington, L., Robinson, M.O., Rome, L.H.** (1999): Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem* **274**: 32712-32717.
- Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T., Kraus, W.L.** (2004): NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* **119**: 803-814.
- Kime, L., Wright, S.C.** (2003): *Mad4* is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. *Biochem J* **370**: 291-298.
- Koonin, E.V., Altschul, S.F., Bork, P.** (1996): BRCA1 protein products, functional motifs. *Nat Genet* **13**: 266-268.
- Krauss, G.** (2003): Biochemistry of signal transduction and regulation. Wiley-VCH.
- Kukimoto, I., Igaki, H., Kanda, T.** (1999): Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase α . *Eur J Biochem* **265**: 936-943.
- Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **15**: 680-685.
- Lee, D., Kim, J.W., Kim, K., Joe, C.O., Schreiber, V., Menissier-de Murcia, J., Choe, J.** (2002): Functional interaction between human papillomavirus type 18 E2 and poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Oncogene* **21**: 5877-5885.
- Lei, M., Tye, B.K.** (2001): Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* **114**: 1447-1454.

- Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B., Tomkinson, A.E.** (2003): Physical and functional interaction between DNA Ligase III α and poly(ADP-ribose)polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**: 5919-5927.
- Levens, D.L.** (2002): Disentangling the MYC web. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**: 5757-5759.
- Levens, D.L.** (2003): Reconstructing Myc. *Genes Dev* **17**: 1071-1077.
- Li, B., Navarro, S., Kasahara, N., Comai, L.** (2004): Identification and biochemical characterization of a Werner's Syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* **279**: 13659-13667.
- Lin, W.-C., Lin, F.-T., Nevins, J.R.** (2001): Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* **15**: 1833-1844.
- Liu, K., Lin, F.-T., Ruppert, M., Lin, W.-C.** (2003): Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol Cell Biol* **23**: 3287-3304.
- Liu, K., Luo, Y., Lin, F.-T., Lin, W.-C.** (2004): TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes Dev* **18**: 673-686.
- Lyons, R.J., Deane, R., Lynch, D.K., Ye, Z.S., Sanderson, G.M., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Daly, R.J.** (2001): Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J Biol Chem* **276**: 17172-17180.
- Makiniemi, M., Hillukkala, T., Tuusa, J., Reini, K., Vaara, M., Huang, D., Pospiech, H., Majuri, I., Westerling, T., Mäkelä, T.P., Syväoja, J.E.** (2001): BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J Biol Chem* **32**: 30399-30406.
- Malanga, M., Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Althaus, F.R.** (1998): Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J Biol Chem* **273**: 11839-11843.
- Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A., Yaffe, M.B.** (2003): BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science* **302**: 636-639.
- Marchetti, M.A., Kumar, S., Hartsuiker, E., Maftahi, M., Carr, A.M., Freyer, G.A., Burhans, W.C., Huberman, J.A.** (2001): A single unbranched S-phase DNA damage and replication fork blockage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7472-7477.
- Marsischky, G.T., Wilson, B.A., Collier, R.J.** (1995): Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase. *J Biol Chem* **270**: 3247-3254.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., Tuschl, T.** (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**: 563-574.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-De Murcia, J., De Murcia G.** (1998): XRCC1 is specifically associated with Poly(ADP-ribose)polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**: 3563-3571.

- Masumoto, H., Sugino, A., Araki, H.** (2000): Dpb11 controls the association between DNA polymerases α and ϵ and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 2809-2817.
- McFarlane, R.J., Carr, A.M., Price, C.** (1997): Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* rad4/cut5 mutant phenotypes: dissection of DNA replication and G2 checkpoint control function. *Mol Gen Genet* **255**: 332-340.
- Mendez, J., Stillman, B.** (2000): Chromatin association of human origin recognition complex, Cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* **20**: 8602-8612.
- Mendoza-Alvarez, H., Alvarez-Gonzalez, R.** (1999): Biochemical characterization of mono(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochemistry* **38**: 3948-3953.
- Mimura, S., Masuda, T., Matsui, T., Takisawa, H.** (2000): Central role for Cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Gen Cells* **5**: 439-452.
- Mimura, S., Takisawa, H.** (1998): *Xenopus* Cdc45-dependent loading of DNA polymerase α onto chromatin under the control of S-phase cdk. *EMBO J* **17**: 5699-5707.
- Morgenstern, J.P., Land, H.** (1990): Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**: 3587-96.
- Morin, V., Diaz, F., Montecino, M., Fothergill-Gilmore, L., Puchi, M., Imschenetzky, M.** (1999): Poly(ADP-ribosylation) protects maternally derived histones from proteolysis after fertilization. *Biochem J* **343**: 95-98.
- Nasheuer, H.P., Smith, R.W.P., Bauerschmidt, C., Grosse, F., Weisshart, K.** (2002): Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 41-94.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., Nurse, P.** (2000): The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**: 625-628.
- Nougarede, R., Della Seta, F., Zarzov, P., Schwob, E.** (2000): Hierachy of S-phase promoting factors: yeast Dbf4-Cdc7 kinase requires prior S-phase cyclin-dependent kinase activation. *Mol Cell Biol* **20**: 3795-3806.
- Nykanen, A., Haley, B., Zamore, P.D.** (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the interference pathway. *Cell* **107**: 309-321.
- Oei, S.L., Griesenbeck, J., Schweiger, M., Ziegler, M.** (1998): Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosylation) of transcription factors. *J Biol Chem* **273**: 31644-31647.
- Ogawa, Y., Takahashi, T., Masukata, H.** (1999): Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol Cell Biol* **19**: 7228-7236.
- O'Hassa, P.O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R., Hottiger, M.O.** (2003): Transcriptional coactivation of nuclear factor- κ B-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem* **278**: 45145-45153.

- Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., Yasui, A.** (2003): Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol* **23**: 3974-3981.
- Ormerod, M.G.** (1994): Flow cytometry: a practical approach. IRL Press, Oxford.
- Osborn, J.A., Elledge, S.J., Zou, L.** (2002): Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* **12**: 509-516.
- Owens, J.C., Detweiler, C.S., Li, J.J.** (1997): *CDC45* is required in conjunction with *CDC7/DBF4* to trigger the initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12521-12526.
- Pan, H., Yin, C., Dyson, N.J., Harlow, E., Yamasaki, L., van Dyke, T.** (1998): Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Mol Cell* **2**: 283-292.
- Parrilla-Castellar, E.R., Karnitz, L.M.** (2003): Cut5 is required for the binding of Atr and DNA polymerase α to genotoxin-damaged chromatin. *J Biol Chem* **278**: 45507-45511.
- Perera, D., Perez-Hidalgo, L., Moens, P.B., Reini, K., Lakin, N., Syväoja, J.E., San-Segundo, P.A., Freire, R.** (2004): TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role for TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint. *Mol Biol Cell* **15**: 1568-1579.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hänel, F., Eilers, M.** (1997): An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J* **16**: 5672-5686.
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., Althaus, F.R.** (2000): Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* **275**: 40974-40980.
- Poirier, G.G., De Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., Mandel, P.** (1982): Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 3423-3427.
- Pospiech, H., Kursula, I., Abdel-Aziz, W., Malkas, L., Uitto, L., Kastelli, M., Vihinen-Ranta, M., Eskelinen, S., Syväoja, J.E.** (1999): A neutralizing antibody against human DNA polymerase ϵ inhibits cellular but not SV40 DNA replication. *Nucleic Acids Res* **27**: 3799-3804.
- Reale, A., De Matteis, G., Galleazzi, G., Zampieri, M., Caiafa, P.** (2005): Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* **24**: 13-19.
- Reini, K., Uitto, L., Perera, D., Moens, P.B., Freire, R., Syväoja, J.E.** (2004): TopBP1 localizes to centrosomes in mitosis and to chromosome cores in meiosis. *Chromsoma* **112**: 323-330.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., Dynlacht, B.D.** (2002): E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G₂/M checkpoints. *Genes Dev* **16**: 245-256.
- Ricke, R.M., Bielinsky, A.K.** (2004): Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- α . *Mol Cell* **16**: 173-178.

- Rodriguez, M., Yu, X., Chen, J., Songyang, Z. (2003) : Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *J Biol Chem* **278**: 52914-52918.
- Roussel, M.F. (1999): The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* **18**: 5311-5317.
- Roy, A.L., Malik, S., Meisterernst, M., Roeder, R.G. (1993): An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature* **365**: 355-359.
- Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A.V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Zhang, M., McManus, M.Z., Gertler, F.B., Scott, M.L., Van Parijs, L. (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**: 401-406.
- Saha, P., Thome, K.C., Yamaguchi, R., Hou, Z., Weremowicz, S., Dutta, A. (1998): The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae Cdc45*. *J Biol Chem* **273**: 18205-18209.
- Saka, Y., Fantes, P., Sutani, T., McInerney, C., Creanor, J., Yanagida, M. (1994): Fission yeast Cut5 links nuclear chromatin and M phase regulator in the replication checkpoint control. *EMBO J* **13**: 5319-5329.
- Saka, Y., Yanagida, M. (1993): Fission yeast *cut5+*, required for S phase onset and M phase restraint, is identical to the radiation-damage repair gene *rad4+*. *Cell* **74**: 383-393.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1998): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh, M.S., Poirier, G.G., Lindahl, T. (1994): Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochem* **33**: 7099-7106.
- Saxena, A., Saffery, R., Wong, L.H., Kalitsis, P., Choo, K.H. (2002): Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem* **277**: 26921-26926.
- Scacheri, P.C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N.J., Wolfsberg, T.G., Umayam, L., Lee, J.C., Hughes, C.M., Shanmugam, K.S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M., Collins, F.S. (2003): Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1892-1897.
- Schagger, H., von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379.
- Schmitz, A.A.P., Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Althaus, F.R., Vergeres, G. (1998): Poly(ADP-ribose) modulates the properties of MARCKS proteins. *Biochem* **37**: 9520-9527.
- Schreiber, V., Ame, J.-C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. (2002): Poly(ADP-ribose)polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* **277**: 23028-23036.

- Sen, G., Wehrman, T.S., Myers, J.W., Blau, H.M.** (2004): Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nat Genet* **36**: 183-189.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., Massague, J.** (2001): TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15^{INK4b}. *Nat Cell Biol* **3**: 400-408.
- Seoane, J., Le, H.-V., Massague, J.** (2002): Myc suppression of the *p21^{Cip1}* Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response DNA damage. *Nature* **419**: 729-734.
- Shall, S.** (2002): Poly(ADP-ribosylation) – a common control process? *Bioessays* **24**: 197-201.
- Sheen, J.H., Dickson, R.B.** (2002): Overexpression of c-Myc alters G(1)/S arrest following ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **22**: 1819-33.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M.** (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501-1512.
- Shiloh, Y.** (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**: 155-168.
- Shirane, D., Sugao, K., Namiki, S., Tanabe, M., Iino, M., Hirose, K.** (2004): Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nat Genet* **36**: 190-196.
- Shrivastava, A., Saleque, S., Kalpana, G.V., Artani, S., Goff, S.P., Calame, K.** (1993): Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* **262**: 1889-1892.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Luo, R.B., Samara, R., Espinoza, L.A., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Smulson, M.E.** (2003): PARP-1 binds E2F-1 independently of its DNA binding and catalytic domains, and acts as a novel coactivator of E2F-1-mediated transcription during re-entry of quiescent cells into S phase. *Oncogene* **22**: 8460-8471.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Hilz, H., Hickey, R., Malkas, L., Applegren, N., Wu, Y., Bers, G., Smulson, M.E.** (1996): The expression of poly(ADP-ribose)polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochem* **35**: 11622-11633.
- Smale, S.T., Baltimore, D.** (1989): The "initiator" as a transcription control element. *Cell* **57**: 103-13.
- Smith, S.** (2001): The world according to PARP. *Trends Biochem Sci* **26**: 174-179.
- Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., de Lange, T.** (1998): Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **282**: 1484-1487.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massague, J., Hänel, F., Eilers, M.** (2001): Repression of p15^{INK4b} expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* **3**: 392-399.
- Stillman, B.** (2005): Origin recognition and the chromosome cycle. *FEBS Letters* **579**: 877-884.

- Stoeber, K., Tisty, T.D., Happerfield, L., Thomas, G.A., Romanov, S., Bobrow, L., Williams, E.D., Williams, G.H.** (2001): DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci* **114**: 2027-2041.
- St. Onge, R.P., Udell, C.M., Casselman, R., Davey, S.** (1999): The human G2 checkpoint control protein hRAD9 is a nuclear phosphoprotein that forms complexes with hRAD1 and hHUS1. *Mol Biol Cell* **10**: 1985-1995.
- Sugimura, T., Fujimura, S., Hasegawa, S., Kawamura, Y.** (1967): Polymerization of the adenosine 5'-diphosphate ribose moiety of NAD by rat liver nuclear enzyme. *Biochim Biophys Acta* **138**: 438-441.
- Sui, G., Soohoo, C., Affar, E.B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.C., Shi, Y.** (2002): A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5515-5520.
- Suzuki, H., Uchida, K., Shima, H., Sato, T., Okamoto, T., Kimura, T., Miwa, M.** (1987): Molecular cloning of cDNA for human poly(ADP-ribose) polymerase and expression of its gene during HL-60 cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **146**: 403-409.
- Szabo, C.** (2000): Cell death. The role of PARP. CRC Press.
- Ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.H.** (2000): Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* **25**: 64-70.
- Tercero, J.A., Labib, K., Diffley, J.F.X.** (2000): DNA synthesis at individual replication forks requires the essential factor Cdc45p. *EMBO J* **19**: 2082-2093.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* **24**: 145-149.
- Trump, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G.R., Bishop, J.M.** (2001): c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* **414**: 768-773.
- Ushiro, H., Yokoyama, Y., Shizuta, Y.** (1987): Purification and characterization of poly(ADP-ribose)synthetase from human placenta. *J Biol Chem* **262**: 2352-2357.
- Vance, V., Vaucheret, H.** (2001): RNA silencing in plants – defense and counterdefense. *Science* **292**: 2277-2280.
- Van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.-P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., Clevers, H.** (2002): The β -Catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**: 241-250.
- Van Haften, G., Vastenhouw, N.L., Nollen, E.A.A., Plasterk, R.H.A., Tijsterman, M.** (2004): Gene interactions in the DNA damage-response pathway identified by genome-wide RNA-interference analysis of synthetic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12992-12996.

- Van Hatten, R.A., Tutter, A.V., Holway, A.H., Khederian, A.M., Walter, J.C., Michael, W.M.** (2002): The *Xenopus* Xmus101 protein is required for the recruitment of Cdc45 to origins of DNA replication. *J Cell Biol* **159**: 541-547.
- Wang H., Elledge, S.J.** (1999): *DRC1*, DNA replication and checkpoint protein1, functions with *DPB11* to control DNA replication and the S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3824-3829.
- Wang, H., Elledge, S.J.** (2002): Genetic and physical interaction between *DPB11* and *DDC1* in the yeast DNA damage response pathway. *Genetics* **160**: 1295-1304.
- Wanzel, M., Herold, S., Eilers, M.** (2003): Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* **13**: 146-150.
- Wanzel, M., Kleine-Kholbrecher, D., Herold, S., Hock, A., Berns, K., Park, J., Hemmings, B., Eilers, M.** (2005): Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol.* **7**: 30-41.
- Weinreich M., Stillman, B.** (1999): Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the *RAD53* checkpoint pathway. *EMBO J* **18**: 5334-5346.
- Wesierska-Gadek, J., Schmid, G., Cerni, C.** (1996): ADP-ribosylation of wild-type p53 *in vitro*: binding of p53 protein to specific p53 consensus sequence prevents its modification. *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 96-102.
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R.** (1978): Biochemical transfer of single copy eukaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* **14**: 725-731.
- Wohlschlegel, J.A., Dhar, S.K., Prokhorova, T.A., Dutta, A., Walter, J.C.** (2002): *Xenopus* Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol Cell* **2**: 233-240.
- Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M.J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., Larsson, L.-G.** (2003): Myc represses differentiation-induced *p21CIP1* expression via Miz-1-dependent interaction with the *p21* core promoter. *Oncogene* **22**: 351-360.
- Xu, Z.-X., Timanova-Atanasova, A., Zhao, R.-X., Chang, K.-S.** (2003): PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol Cell Biol* **23**: 4247-4256.
- Yamamoto, R.R., Axton, J.M., Yamamoto, Y., Saunders, R.D.C., Glover, D.M., Henderson, D.S.** (2000): The *Drosophila mus101* gene, which links DNA repair, replication and condensation of heterochromatin in mitosis, encodes a protein with seven BRCA1 C-terminus domains. *Genetics* **156**: 711-721.
- Yamane, K., Chen, J., Kinsella, T.J.** (2003): Both DNA topoisomerase II-binding protein 1 and BRCA1 regulate the G₂-M cell cycle checkpoint. *Cancer Res* **63**: 3049-3053.
- Yamane, K., Katayama, E., Tsuruo, T.** (2001): p53 contains a DNA break-binding motif similar to the functional part of BRCT-related region of Rb. *Oncogene* **20**: 2859-2867.

- Yamane, K., Kawabata, M., Tsuruo, T.** (1997): A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *Eur J Biochem* **250**: 794-799.
- Yamane, K., Tsuruo, T.** (1999): Conserved BRCT regions of TopBP1 and of the tumor suppressor BRCA1 bind strand breaks and termini of DNA. *Oncogene* **18**: 5194-5203.
- Yamane, K., Wu, X., Chen, J.** (2002): A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol* **22**: 555-566.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsur, M., Fitzgerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofman, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L.P., Sonenshein, G.E.** (2001): Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**: 1688-1702.
- Yoshida, K., Inoue, I.** (2004): Expression of MCM10 and TopBP1 is regulated by cell proliferation and UV irradiation via the E2F transcription factor. *Oncogene* **23**: 6250-6260.
- Yu, S.-W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L.** (2002): Mediation of poly(ADP-ribose)polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**: 259-263.
- Yu, X., Christiano, C., Chini, S., He, M., Mer, G., Chen, J.** (2003): The BRCT-domain is a phospho-protein binding domain. *Science* **302**: 639-642.
- Yung, T.M.C., Sato, S., Satoh, M.S.** (2004): Poly(ADP-ribosylation) as a DNA damage-induced post-translational modification regulating poly(ADP-ribose)polymerase-1-topoisomerase I interaction. *J Biol Chem* **279**: 39686-39696.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P.** (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33.
- Zhang, X., Morera, S., Bates, P.A., Whitehead, P.C., Coffey, A.I., Hainbucher, K., Nash, R., Sternberg, M.J., Lindahl, T., Freemont, P.S.** (1998): Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. *EMBO J* **17**: 6404-6411.
- Zheng, C.-F., Guan, K.-L.** (1994): Cytoplasmic localization of the mitogen-activated protein kinase activator MEK. *J Biol Chem* **269**: 19947-19952.
- Zhou, B.-B. S., Elledge, S.J.** (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433-439.
- Zou, L., Mitchell, J., Stillman, B.** (1997): *CDC45*, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol* **17**: 553-563.
- Zou, L., Stillman, B.** (2000): Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* **20**: 3086-3096.

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis März 2005 am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Saluz danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Dissertation anzufertigen. Seine Unterstützung und kritische Diskussion waren mir sehr wertvoll.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Frank Hänel, der mir nicht nur das Thema bereitstellte, sondern mich jederzeit unterstützte und ermutigte. Er stand mir mit seinem Rat und seiner Erfahrung zur Seite. Ihm verdanke ich viele methodische Anregungen und hilfreiche Diskussionen bei der Interpretation der Experimente.

Mein Dank gilt weiterhin Claudia Franke und Christian Ußkilat für die angenehme Arbeitsatmosphäre und technische Unterstützung. Für die freundliche Zusammenarbeit möchte ich mich weiterhin bei Grit Mrotzek, Sweta Bauer, Gino Limmon, Thomas Kirchner sowie allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Zell- und Molekularbiologie bedanken. Für die hilfreichen Hinweise zur Durchflusszytometrie danke ich Matthias Nestler, und Grit Mrotzek für die Durchführung der Sequenzanalysen.

Die Zusammenarbeit mit dem IMT Marburg war eine wichtige Grundlage für diese Arbeit. Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Martin Eilers für seine wertvolle fachliche Unterstützung. Weiterhin danke ich ihm und seinen Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung während meiner Aufenthalte in Marburg. Dr. Michael Krause, Angelika Filmer und Birgit Samans danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Mikroarray-Experimente.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Große und Christina Bauerschmidt (IMB, Jena) möchte ich mich herzlich für die kooperative Zusammenarbeit auf dem Gebiet der DNA-Replikation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Zipfel danke ich für die Möglichkeit das Durchflusszytometer zu nutzen.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, Literatur und persönlichen Mitteilungen angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät ist mir bekannt.

Jena, 2. Mai 2005

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Yvonne Wollmann
Geburtsdatum: 13. April 1976
Geburtsort: Jena
Wohnort: Lutherstr. 90
07743 Jena
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1982-1990 Polytechnische Oberschule Thomas Müntzer , Tröbnitz
1990-1994 Albert-Schweitzer-Gymnasium Jena, Abitur

Hochschulstudium

Sep. 1994- März 2000 Studium der Biologie an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena
Diplomarbeit in der klinischen Forschergruppe der Gynäkologischen Molekularbiologie der Frauenklinik, FSU Jena
Thema: „Transduktion und Expression der Zytokingene für GM-CSF und IL-4 in Zervixkarzinomzellen zur Stimulation dendritischer Zellen“

Beruflicher Werdegang

15. April 2000 - 31. Dez. 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der klinischen Forschergruppe der Gynäkologischen Molekularbiologie der Frauenklinik, FSU Jena
1. Jan. 2002 - 31. März 2005 Promotion am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Hans-Knöll-Institut Jena, Abteilung Zell- und Molekularbiologie
Thema: „Das Miz1-interagierende Protein TopBP1: Identifizierung neuer Interaktionspartner und Untersuchungen zur Rolle bei der Zellzyklusregulation“

Jena, 2. Mai 2005

